

**ÜBER DIE BINDUNG MORPHINARTIGER
ANALGETIKA AN PLASMAPROTEINE UND
GEWEBSHOMOGENATE:
DIE HYDROPHOBE WECHSELWIRKUNG
ALS VORHERRSCHENDER BINDUNGSFAKTOR**

Volker Höllt

1973

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE MÜNCHEN

ÜBER DIE BINDUNG MORPHINARTIGER ANALGETIKA AN PLASMA-
PROTEINE UND GEWEBSHOMOGENATE: DIE HYDROPHOBE WECH-
SELWIRKUNG ALS VORHERRSCHENDER BINDUNGSFAKTOR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Volker H ö l l t
aus München

München 1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. A. Herz
Mitberichterstatter: Prof. M. Kiese
Dekan: Prof. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1973

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

2 METHODIK

21 Materialien

- 211 Substanzen
- 212 Proteinlösungen
- 213 Pufferlösungen
- 214 Dialysemembranen

22 Methoden

- 221 Gleichgewichtsdialyse
- 222 Ultrafiltration
- 223 Konzentrationsbestimmung der radioaktiv markierten Substanzen
- 224 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten
- 225 Bestimmung des Wassergehalts der Proteinlösungen
- 227 pH-Bestimmungen

23 Charakterisierung der Bindung

- 231 Berechnung des Anteils an gebundener Substanz (B-Wert)
- 232 Bestimmung von Bindungsparametern nach SCATCHARD
- 233 Bestimmung von Bindungsparametern nach ROSENTHAL
- 234 Bestimmung der thermodynamischen Parameter

3 ERGEBNISSE

31 Bindung an Plasmaproteine

- 311 Bindung an Albumin und Plasma
- 312 Albuminbindung in der Darstellung nach SCATCHARD
- 313 Plasmabindung in der Darstellung nach ROSENTHAL

32 Bindung in Gewebshomogenaten

- 321 Bindung an Homogenate (B-Wert)
- 322 Morphin-Gehirnhomogenat-Bindung in der Darstellung nach ROSENTHAL
- 323 Extrapolation auf die Bindung an unverdünnte Homogenate
- 324 Vergleich der in vitro gemessenen Gewebsbindung mit den in vivo erhaltenen Gewebskonzentrationen

33 Die hydrophobe Wechselwirkung als vorherrschender Bindungstyp

- 331 Beziehung zwischen Bindung und Verteilungskoeffizient
- 332 Abhängigkeit der Bindung von der Elektrolytkonzentration
- 333 Temperaturabhängigkeit der Bindung

34 Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert

- 341 Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten vom pH der wässrigen Phase
- 342 Abhängigkeit der Bindung an Plasmaproteine vom pH der Proteinlösung

4 DISKUSSION

41 Pharmakokinetische Aspekte

- 411 Unterschied zwischen den in vivo gefundenen Substanzkonzentrationen im Gewebe und den auf Grund der Bindung kalkulierten
- 412 Zunahme des Quotienten Konzentration im Gewebe/ Konzentration im Plasma mit zunehmender Lipophilie
- 413 Einfluß von Änderungen der Bindung im Plasma und im Gewebe auf die Verteilung der Pharmaka

42 Spezifische Bindung morphinartiger Analgetika

- 421 Möglichkeiten und Versuche, die Bindung eines Pharmakons an seine Rezeptoren in vitro nachzuweisen
- 422 Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen GOLDSTEINS et al. 1971
- 423 Bedeutung der ionalen Bindungskomponente für die Receptor-Interaktion

43 Hydrophobe Wechselwirkung

- 431 Korrelation von Bindung und Verteilungskoeffizient
- 432 Bindungsverhalten bei Änderung der Ionenkonzentration
- 433 Temperaturabhängigkeit der Bindung
- 434 pH-Abhängigkeit der Bindung

44 Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert der Proteinlösung

- 441 Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf die Bindungseigenschaften des Albumins
- 442 Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf den Dissoziationsgrads der Substanzen
- 443 Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf die Eigenschaften der wässrigen Phase
- 444 Die Änderung des Ionisationsgrads der untersuchten Analgetika in Abhängigkeit vom pH-Wert
- 445 Bedeutung des Dissoziationsgrads der Substanzen für die Bestimmung der Bindungsparameter nach SCATCHARD

5 ZUSAMMENFASSUNG

6 INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

Der Bindung von Pharmaka im Blut und in den Geweben wird in wachsendem Maß Beachtung geschenkt. Dies liegt nicht nur an der Bedeutung, welche die Proteinbindung im Rahmen pharmakokinetischer Fragestellungen hat, sondern auch am Modellwert, der solch einfachen Bindungszuständen für die Untersuchung von Pharmakon-Rezeptor-Interaktionen zukommt.

Besonders die Plasmabindung wurde häufig untersucht, wie es die Übersichtsarbeit von MEYER und GUTTMAN (1968) zeigt, in der über 500 Publikationen der letzten 25 Jahre zitiert sind. Aus diesen Untersuchungen über unspezifische Bindungen ergaben sich Hinweise auf Mechanismen der Bindung, wie sie im Prinzip auch bei spezifischen Bindungen eine Rolle spielen.

Wurde zunächst durch Bindungsversuche mit anionischen Substanzen die Aufmerksamkeit auf elektrostatisch bedingte Bindungen gelenkt (SCATCHARD 1949, KLOTZ und URQUART 1949), so finden in letzter Zeit die hydrophoben Wechselwirkungen immer mehr Beachtung (KAUZMANN 1959, HANSCH et al. 1965, BIRD und MARSHALL 1967, SCHOLTAN 1968). Sie beruhen darauf, daß der Übertritt eines verglichen mit Wasser weniger polaren Moleküls aus der wässrigen Phase an die apolaren Strukturen von Proteinen thermodynamisch begünstigt ist (KAUZMANN 1959). Die Verteilung einer derartigen Substanz zwischen Wasser und einer weniger polaren Phase richtet sich nach der gleichen Gesetzmäßigkeit: So konnten einige Autoren (HANSCH et al. 1965, FUJITA et al. 1964, SCHOLTAN 1968) eine enge Korrelation zwischen Proteinbindung und Verteilungskoeffizient für viele Substanzgruppen zeigen.

Wie erwähnt sind auch im Zusammenhang mit pharmakokinetischen Betrachtungen Bindungen an Plasma und Gewebe von Interesse. Nach GOLDSTEIN (1949) sowie BRODIE und HOGGEN (1957) besteht die Bedeutung der Plasmabindung darin, daß nur die nicht gebundenen Moleküle eines Pharmakons aus der Blutbahn in die Gewebe übertreten können. Zwei- bzw. Dreikompartimentmodelle, in denen die Abhängigkeit der Substanzkonzentrationen im Gewebe von der Bindung an Plasma- und Gewebsproteinen gezeigt wird, haben MARTIN (1965) und CURRY (1970) aufgestellt.

Im Rahmen einer größeren Untersuchung über den Wirkort morphinartiger Analgetika und deren Permeation durch die Blut-Gehirnschranke nach intravenöser und intraventrikulärer Applikation

(HERZ und TESCHEMACHER 1971) stellte sich dementsprechend die Frage nach der Proteinbindung dieser Substanzen. Diese wurde bis jetzt nur wenig untersucht: Für die Bindung von Morphin an Humanplasma bzw. Humanserum finden sich Angaben in den Arbeiten von BLANEY und WOODS (1956) sowie bei GANSHORN und KURZ (1968). Über die Bindung von Dihydromorphin an Menschen- und Rattenserum, sowie an verschiedene Gewebshomogenate der Ratte liegen Untersuchungen von VAN PRAAG und SIMON (1966) vor. Die Bindung von Methadon an Humanalbumin wurde von OLSEN (1972) bestimmt.

Das Interesse am Mechanismus der analgetischen Wirkung und an der Entwicklung physischer Abhängigkeit von Morphin führte im Laufe der letzten Jahre zu - allerdings bislang erfolglosen - Bemühungen um den Nachweis und die Lokalisation spezifischer Bindungsstellen. Studien über subzelluläre Verteilung von Dihydromorphin finden sich bei VAN PRAAG und SIMON (1966), sowie bei HUG und OKA (1971). MULE et al. (1967) untersuchten die subzelluläre Verteilung des Morphin. GOLDSTEIN et al. (1971) machten den Versuch, durch Vergleich der Bindung des Morphin-synergisten Levorphanol mit derjenigen des unwirksamen, stereoisomeren Dextrorphans spezifische und unspezifische Bindungsstellen im Mäusegehirnhomogenat aufzufinden.

Vergleichende Untersuchungen über die Proteinbindung morphinartiger Analgetika unter dem Aspekt des Bindungsmechanismus dieser Substanzen finden sich bisher nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bindung der morphinartigen Substanzen Dihydromorphin, Morphin, Etorphin und Fentanyl an Albumin, Plasma und Gewebshomogenate bestimmt und der Versuch gemacht, den Bindungsmechanismus zu charakterisieren. Die bekannten Methoden der Ultrafiltration und der Gleichgewichtsdialyse wurden zu diesem Zweck modifiziert und verfeinert.

2 METHODIK

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen

Die vier untersuchten Analgetika vom Morphintyp sind in Abbildung 1 aufgeführt:

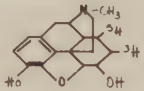
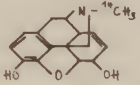
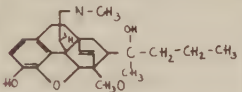
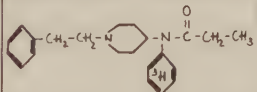
Substanz	Konstitutionsformel	Molekulargew. (Base)	Spez. Akt. (mCi/mMol)	pK in H ₂ O
³ H-Dihydromorphin HCl		288	290.2	9.25
¹⁴ C-Morphin HCl		286	45.4	8.2
³ H-Etorphin HCl		412	222.5	7.0
³ H-Fentanyl Dihydrogen citrat		336	100.0	7.8

Abb. 1 Strukturformeln, Molekulargewichte, spezifische Aktivitäten und pK-Werte der untersuchten Analgetika

³H-Dihydromorphin (Dr. Hug, Department of Pharmacology, University of Michigan, Ann Arbor, USA)

¹⁴C-Morphin (The Radiochemical Center Amersham, England)

³H-Etorphin (Dr. Dobbs, Reckitt a. Sons, Ltd., Hull, England)

³H-Fentanyl (Dr. Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien)

pK_{H₂O}-Werte:

Dihydromorphin und Morphin: PERRIN (1965)

Etorphin und Fentanyl: Angaben der Herstellerfirmen

Die radiochemische Reinheit der Substanzen wurde chromatographisch geprüft; sie lag zwischen 96 und 99,9%.

212 Proteinlösungen

2121 Humanserumalbumin

(kristallisiert "reinst", Elektrophorese auf Cello-gel 98% min, H₂O 5%, NaCl 0,2%, Kohlehydrate 0,05%, SERVA Heidelberg)

2122 Humanplasma

Es wurde Mischplasma von vier gesunden Versuchspersonen verwendet. Um die physiologische Proteinkonzentration zu erhalten, wurde das Blut nicht wie üblich mit einem Fünftel des Blutvolumens an 3,8 prozentigem Natriumcitrat, sondern mit 33 prozentigem (2 ml Citrat auf 100 ml Blut) ungerinnbar gemacht (FRIE-MEL 1968). Die Eiweißbestimmung ergab eine Proteinkonzentration von 7,1 g%; der Albuminanteil betrug 70%.

2123 Kaninchenplasma

Mischplasma von jeweils drei Tieren wurde untersucht. Den mit Pentobarbital narkotisierten 2,5 bis 3,5 kg schweren Kaninchen wurde unter Zusatz von 33 prozentigem Citrat Blut aus der Arteria Carotis entnommen. Wie aus Kontrollversuchen mit durch Äther narkotisierten Tieren hervorging, hatte das Pentobarbital keinen Einfluß auf die Bindung der untersuchten Substanzen. Ebenso konnte kein Bindungsunterschied bei Plasmaproben gefunden werden, in denen statt Natriumcitrat ein Heparinoid (Eli-paron^R) als Antikoagulans verwendet wurde. Die Proteinkonzentration betrug 5,3 $\pm$ 0,6 g%. In den meisten Fällen wurden die Bindungsversuche mit Plasmen, die am selben Tag gewonnen wurden durchgeführt. Proben, die länger als eine Woche bei Kühlraumtemperatur (3°C) lagerten, wurden verworfen. Während der pH-Wert im Blut stabil blieb, änderte er sich im Plasma sofort nach Abtrennung der Erythrozyten. Um eine pH-Verschiebung während des Dialyse- und Ultrafiltrationsvorgangs zu vermeiden, wurden daher die Plasmen vor Versuchsbeginn bis zur Stabilisierung des pH in einer offenen Petrischale aufbewahrt. Nach etwa einer Stunde stellte sich ein pH-Wert von durchschnittlich 8,6 ein. Dann wurde durch Pufferzusatz der gewünschte pH-Wert eingestellt.

2124 Organhomogenate

Die Kaninchen wurden entblutet; die zu untersuchenden Organe

rasch entnommen und in Potter-Elvehjem-Homogenisatoren eingewogen; im gewünschten Verhältnis Gewebsgewicht/Homogenatvolumen (g/V) wurde Puffer zugesetzt und anschließend unter Kühlung homogenisiert. Bei einem Verdünnungsverhältnis von g/V = 0,25 ließ sich das Homogenat ohne Schwierigkeiten pipettieren. Da der pH-Wert unverdünnter Gewebshomogenate leicht sauer war (pH 6,5 bis pH 6,9), wurde der Puffer immer so angesetzt, daß das verdünnte Homogenat den gewünschten pH-Wert von 7,4 ergab.

213 Pufferlösungen

Als Standardpuffer diente eine 0,13 molare KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 -Lösung (Ionenstärke 0,34 bei pH 7,4). Ein wesentlicher Einfluß von Seiten des Donnan-Effekts auf die Bindung war bei dieser Ionenstärke nicht zu erwarten, da KLOTZ und URQUART (1949) zeigen konnten, daß dieser Puffer sehr wenig mit dem Proteinbindungsvorgang interferiert. Vergleichende Bindungsbestimmungen an Plasmen, die mit Ultrafiltrat bzw. Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt waren, ergaben bei pH 8,6 annähernd gleiche Bindungen für Morphin sowie für Fentanyl (Tabelle 1).

	Plasma + Ultrafiltrat	Plasma + Phosphatpuffer
Morphin	30,8 $\pm$ 2,5	32,5 $\pm$ 3,4
Fentanyl	89,6 $\pm$ 0,9	91,7 $\pm$ 0,7

Tab.1 Bindung von Morphin und Fentanyl (gebundener Anteil des Pharmakons in %) in Plasma-Plasmaultrafiltrat-Ansätzen und in Plasma-Phosphatpuffer-Ansätzen (Mischungsverhältnis 1:1) bei pH 8,6; Gleichgewichtsdialyse; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 7 Versuchen.

Der Phosphatpuffer in der hier gewählten Ionenstärke (0,39 bei pH 8,6) scheint also die Bindung wenig zu beeinflussen. Höhere Ionenstärken führen jedoch zu einer Erhöhung der Bindung (siehe 332!). Testversuche mit 0,13 molarem Tris-Puffer ergaben deutlich niedrigere Bindungswerte, die durch die geringere Ionenstärke des Puffers bedingt sein können.

214 Dialysemembranen

Visking Dialyseschläuche vom Typ 8/32 und 20/32 (SERVA, Heidel-

berg) mit mittlerem Porenradius von 24 Angström wurden zwei Stunden in destilliertem Wasser gewässert und kurz luftgetrocknet. Der weitleumige Schlauch (20/32) wurde zur Herstellung der kreisrunden Membranen (Durchmesser 4 cm) für die Dialyseapparatur verwendet; der enge Schlauch (8/32) wurde - mit den verschiedenen Proteinlösungen gefüllt - für die Ultrafiltration benutzt.

22 Methoden

221 Gleichgewichtsdialyse

Für die Gleichgewichtsdialyse wurden Kammern entwickelt, deren unmittelbares Vorbild eine von WEDER und BICKEL (1970) konstruierte Kammer war. Dieser Kammertyp war bereits im Prinzip von SCHOLTAN (1962) beschrieben worden.

Für Serienuntersuchungen erschien es sinnvoll, jeweils zehn dieser Kammern so zusammen zu setzen, daß die Vorderwand der einen Kammer gleichzeitig die Rückwand der nächsten bildete. Die so gefertigten Zehnereinheiten rotierten in einem Luftthermostaten mit 60 bis 120 Umdrehungen pro Minute. Abbildung 2 zeigt eine Aufnahme der Dialyseapparatur und einen Querschnitt durch eine Kammer. Die Kammern wurden durch die Dialysemembranen jeweils in zwei Zellen geteilt. Stärke und Innendurchmesser der Teflonringe bestimmten das Zellvolumen, das in unseren Untersuchungen 1,4 ml betrug, jedoch durch Einsatz anderer Teflonringe variiert werden konnte. Die Ringe hatten Bohrungen, durch welche die Zellen gefüllt und entleert werden konnten. Sie wurden durch konisch zugeschliffene Drahtstifte aus nichtrostendem Stahl verschlossen. In der einen Zelle befand sich die Proteinlösung, in der anderen der Puffer. Die Substanz wurde der Pufferlösung zugesetzt. Nach Beendigung der Dialyse wurde die Substanzkonzentration in Puffer und Proteinlösung bestimmt.

Vorteile dieser Apparatur sind:

- a) Infolge der relativ großen Austauschflächen und der beträchtlichen Konvektion erreicht man kurze Dialysierzeiten, die für die Kombination Puffer/Puffer 1 Stunde, für Puffer/Plasma $2^{1/2}$ und für Puffer/Homogenat 4 Stunden bei 37°C betrugen.
- b) Geringe Volumina; für einen Bindungsversuch wurden nur jeweils 0,75 ml Proteinlösung und 0,75 ml Puffer pro Zelle benötigt.

Fehlermöglichkeiten wurden wie folgt berücksichtigt:

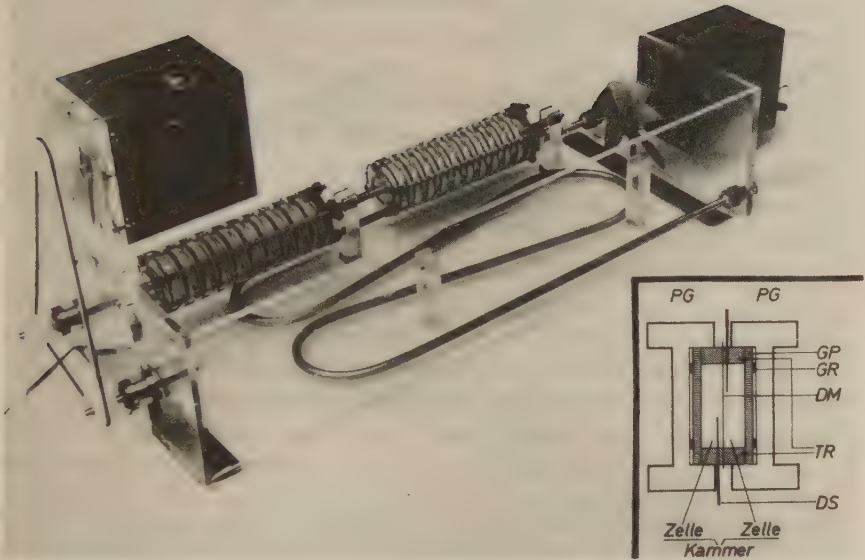


Abb. 2

- a) Gleichgewichtsdialyse-Einheiten mit jeweils 10 Dialysekammern, in einem Luftthermostaten rotierend. Antriebsmotor, Propeller zur Luftumwälzung mit Antrieb, Heizschlange, die von einem daneben stehenden Wasserbad beschickt wird.
- b) Querschnitt durch eine Dialysekammer:
 PG = Plexiglasgehäuse; GP = Glasplatte; GR = Gummiring;
 DM = Dialysemembran; TR = Teflonring; DS = Drehtstift;

- a) Das Ausmaß der Adsorption der Substanzen an die Dialysmembranen und an die Innenwände der Kammerzellen (Teflonringe und Glasscheiben) konnte durch Konzentrationsbestimmung in beiden Zellen erfaßt werden. Adsorptionsphänomene fanden sich hierbei nur bei den lipophilen Pharmaka Fentanyl und Etorphin, beeinflussten jedoch das Ergebnis nicht, da die dem Bindungsgleichgewicht entsprechende Konzentration in beiden Zellen bestimmt wurde.
- b) Kolloidosmotische Effekte, die zu einer Volumenvermehrung in der Zelle führten, die das Protein enthielt, wurden durch Bestimmung der Flüssigkeitsvolumina in beiden Zellen nach Versuchsende erfaßt und in Form eines Volumenfaktors berücksichtigt.
- c) Der Donnan-Effekt, bedingt durch den im untersuchten pH-Bereich vorhandenen Anionenüberschuß der Proteine, konnte durch die Verwendung eines Phosphatpuffers mit relativ hoher Ionenstärke klein gehalten werden ($I = 0,34$ bei pH 7,4). Legt man diese Ionenstärke zugrunde, so beträgt bei pH 7,4 für eine der höchsten hier verwendeten Albuminkonzentrationen ($5 \text{ g\%} = 7,25 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$) das auf Grund des Donnan-Effekts zu erwartende Verteilungsverhältnis univalenter Kationen zwischen Proteinlösung und Pufferlösung 1,02. Dabei wird vorausgesetzt, daß das Albumin bei diesem pH-Wert einen negativen Ladungsüberschuß von 18 besitzt (TANFORD et al. 1955). Interessanterweise führte der Versuch, die Natriumverteilung zwischen Kaninchenplasma und Puffer mittels ^{22}Na festzustellen, zu einem Natriumüberschuß von 12,5% in der Proteinlösung, was fast ausschließlich auf eine Natriumbindung zurückzuführen sein dürfte.
- d) Proteindenaturierungen und bakterielle Zersetzung spielten offensichtlich während der maximal benötigten Dialysezeiten keine Rolle. Die Bindung von Fentanyl an Gehirnhomogenat - wie in Kontrollversuchen festgestellt wurde - blieb bei Dialysezeiten zwischen 4 und 24 Stunden konstant.
- e) Die Membrandurchlässigkeit für Substanzen wurde geprüft: Zusetzen der Pharmaka zur Proteinlösung sowie zum Puffer führte zur Einstellung desselben Gleichgewichts.

222 Ultrafiltrationsmethode

Die einfach herzustellende Anordnung zeigt Abbildung 3. Am Boden eines 10 ml - Zentrifugenglases befand sich ein Reaktionsgefäß (EPPENDORF). Darüber wurde eine Einmalspritze (2 ml) aus

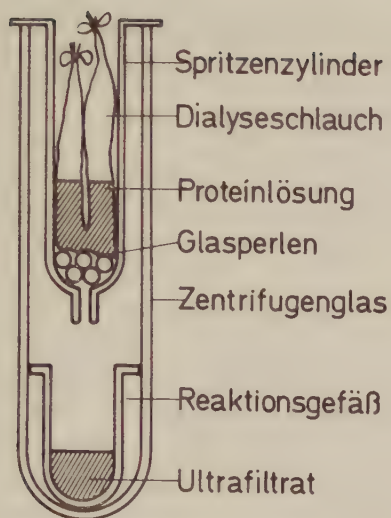


Abb. 3

Anordnung für Ultrafiltration: Spritzenzylinder und Reaktionsgefäß befinden sich in einem Zentrifugenglas (Durchmesser: 16 mm, Länge: 9,5 cm). Das Ultrafiltrat wird durch Zentrifugieren der Einheit gewonnen. (siehe Text!)

Polypropylen (BRAUN-MELSUNGEN), deren Stempel entfernt wurde, eingehängt. In den leeren Spritzenzylinder, in dem sich Glasperlen (Durchmesser ca. 2 mm) befanden, um den Abfluß des Ultrafiltrats durch den Spritzenkonus zu gewährleisten, wurde der 2 ml Proteinlösung enthaltende Dialysesack u-förmig eingebracht (mit den beiden Knotenenden nach oben). Nach luftdichtem Verschluss (Parafilm) wurden die Einheiten 6 bis 8 Stunden bei 37°C bzw. 3°C bei 3000 Umdrehungen pro Minute (= 1150 g) zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden bei den Homogenaten ($g/V = 0,25$) ca. 25% des in den Dialysesack gefüllten Volumens an Ultrafiltrat gewonnen. Vor Beginn der Ultrafiltration wurden die Substanzkonzentrationen in der Proteinlösung und nach Beendigung im Ultrafiltrat bestimmt.

Nach SCHOLTAN (1961) sind die drei Hauptfehlerquellen der Ultrafiltrationsmethode die Adsorption des Pharmakons an die Membran, die Konzentrierung des Proteingehalts während der Ultrafiltration und der sogenannte Siebeffekt.

a) Adsorption an die Schlauchmembran, sowie an die sonstigen Materialien der Apparatur war für Dihydromorphin und Morphin nicht nachweisbar. Dagegen zeigten Fentanyl und Etorphin gerin-

ge Adsorption.

b) Die Konzentrierung des Proteingehalts während der Ultrafiltration spielt für die hier untersuchten Bindungen an Homogenate keine Rolle: Parallelversuche mit der Dialysemethode ergaben keine Änderung der Bindungskonstante ($n \cdot k$) für steigende Homogenatkonzentrationen ($g/V = 0,12$ bis $0,5$, siehe 323!). Die durch das Abfiltrieren des Ultrafiltrats entstandene Konzentrierung eines 25 prozentigen Homogenats ($g/V = 0,25$) liegt in diesem Bereich. Analoges gilt für die mit verdünntem Plasma durchgeführten Versuche.

c) Dagegen ist der Siebeffekt (SCHOLTAN 1961) oder Rückhalteeffekt (vom BRUCK und KUHNE 1961) von größerer Bedeutung. Er beruht darauf, daß Ultrafilter wie der benützte Visking-Dialyseschlauch nicht nur Moleküle mit Molekulargewicht größer als 10 000 restlos zurückhalten, sondern auch schon kleinere Moleküle (Molekulargewicht kleiner als 500) zumindest langsamer als Wasser passieren lassen. Abbildung 4 zeigt die Konzentrationszunahme von Morphin in Ultrafiltratfraktionen, die zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des Ultrafiltrationsvorgangs gewonnen wurden.

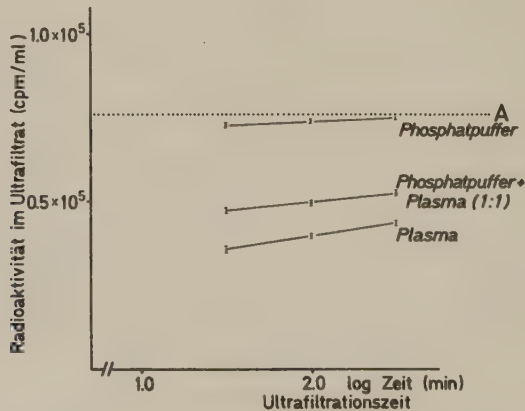


Abb. 4 Rückhalteeffekt bei der Ultrafiltration: Konzentrationen von Morphin (Radioaktivitäten) in Ultrafiltratfraktionen zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des Filtrationsprozesses; pH 8,6; 20°C; A = Konzentration vor Beginn der Ultrafiltration in Phosphatpuffer, Phosphatpuffer-Plasma-Gemisch und Plasma; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Versuchen.

Wird Morphin in Puffer gelöst und die Lösung ultrafiltriert, so sind infolge des Siebeffektes die Konzentrationen an Morphin in den ersten Ultrafiltratfraktionen niedriger als in der nicht filtrierten Morphinlösung. Erst wenn - wiederum durch den Siebeffekt bedingt - die Morphinkonzentration im Schlauch anwächst, wird auch die Konzentration im Ultrafiltrat höher. Wird Morphin in Plasma-Pufferlösung oder unverdünntem Plasma gelöst und filtriert, sind die Konzentrationen im Ultrafiltrat geringer und der Anstieg noch steiler. Porenverstopfung durch Plasmaproteine könnte dabei als Ursache eine Rolle spielen. Da dieser methodische Fehler nicht ausgeglichen werden konnte, wurde die Ultrafiltrationsmethode nur dort verwendet, wo sie gewisse Vorteile gegenüber der Dialysemethode hat, wie z.B. beim Bindungsversuch mit Organhomogenaten, bei denen die Dialysezellen keine idealen Diffusionsbedingungen bieten. Wird nämlich die Ultrafiltrationszeit entsprechend ausgedehnt, so lassen sich trotz der beschriebenen Fehlermöglichkeiten Bindungen bestimmen, die in der Größenordnung der mittels Dialyse erhaltenen Werte liegen, wie Tabelle 2 zeigt.

	Kaninchenplasma - Phosphatpuffer (1:1); pH 8,6		Kaninchengehirnhomogenat (g/V = 0,25) pH 7,4	
	Dialyse	Ultrafiltration	Dialyse	Ultrafiltration
Morphin	32,5 $\pm$ 3,4	29,2 $\pm$ 2,2	17,3 $\pm$ 1,1	18,0 $\pm$ 3,2
Fentanyl	91,6 $\pm$ 0,7	90,3 $\pm$ 1,2	69,4 $\pm$ 1,7	69,0 $\pm$ 2,3

Tab.2 Bindungen von Morphin und Fentanyl an Kaninchenplasma und Kaninchengehirnhomogenat (Anteil der gebundenen Substanz in %), gemessen mittels Gleichgewichtsdialyse und Ultrafiltration bei 37°C; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 bis 7 Versuchen.

223 Konzentrationsbestimmung der radioaktiv markierten Substanzen

Die Konzentrationen der Verbindungen wurden als Radioaktivitäten in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (BECKMAN LS 150)

gemessen. Die quench-Korrektur erfolgte mittels externer Standardisierung in Eichproben; die Übereinstimmung des quench-Faktors in Eich- und Versuchsproben wurde mittels externer Standardisierung in Kombination mit der Kanal-Verhältnis-Methode kontrolliert. 0,1 ml Puffer bzw. Proteinlösung wurden zu 10 ml Szintillationslösung gegeben. Die Aktivitäten der hydrophilen Substanzen Dihydromorphin und Morphin wurden mittels Dioxan-szintillationslösung - BRAY'sche Lösung ohne POPOP (BRAY 1960) - bestimmt, die der lipophilen Substanzen Fentanyl und Etorphin mit Toluolszintillationslösung (4 g Diphenyloxazol, Toluol ad 1000). Die Ausbeute für ^{14}C -Morphin betrug 98%, für ^3H -Dihydromorphin, ^3H -Etorphin und ^3H -Fentanyl 30 bis 40%. Von jedem Versuchsansatz wurden drei Proben hergestellt und diese zweimal 10 Minuten gemessen.

Bei zwei Verbindungen (Etorphin und Fentanyl) wurde geprüft, ob sich in den Homogenaten während der Dialyse und Ultrafiltration Metaboliten gebildet hatten. Dabei fand eine von HEB et al. (1972) beschriebene Methode Anwendung, nach der sich lipophile, radioaktiv markierte Verbindungen von ihren hydrophilen Stoffwechselprodukten trennen lassen: Wässrige Phase, die Substanz und Metaboliten enthält, wird sowohl der Dioxan- als auch der Toluolszintillationslösung zugesetzt. Die Dioxanlösung nimmt die wässrige Phase vollkommen auf, die Toluollösung überhaupt nicht. In der Dioxanlösung werden also Substanz und Metaboliten gelöst und demnach deren Aktivitäten gezählt; in die Toluollösung tritt dagegen nur die lipophile Ausgangssubstanz über, nicht aber die hydrophilen Metaboliten. In den nach dieser Methode untersuchten Homogenaten zeigten sich nach achtstündiger Inkubation bei 37°C keine Metaboliten.

224 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Die Verteilung der Substanzen zwischen n-Heptan bzw. n-Oktanol und 0,13 molarem Phosphatpuffer (pH 5,0 bis pH 9,0) wurde bei 37°C und 3°C bestimmt. Der Verteilungskoeffizient errechnete sich aus dem Verhältnis "Substanzkonzentration in der Lipoidphase" zu "Substanzkonzentration in der wässrigen Phase". Die Verbindungen wurden im Puffer gelöst; diese Substanzlösung wurde eine Stunde lang mit der Lipoidphase geschüttelt. Danach wurden die Substanzkonzentrationen in der wässrigen und in der Lipoidphase gemessen. Eine Anhäufung der Substanzen an den Phasengrenzflächen wurde nicht beobachtet: Die Substanzmengen, die

dem Zweiphasensystem zugegeben worden waren, wurden nach dem Schütteln als Summe der Mengen in den beiden Phasen wiedergewonnen.

225 Bestimmung des Wassergehalts der Proteinlösungen

Die Totalkonzentration an Substanz in den Proteinlösungen entspricht der Summe der Konzentrationen an gebundener und freier Substanz, und zwar in dem Volumen, in dem sie sich tatsächlich verteilen können, d.h. also nur in der wässrigen Phase, nicht jedoch in dem Volumen, das vom Protein eingenommen wird. Der eigentliche Lösungsraum ist vermutlich noch kleiner, da nicht die gesamte wässrige Phase als Lösungsraum zur Verfügung zu stehen braucht. Jedoch bietet der Wassergehalt der Proteinlösungen einen brauchbaren Näherungswert, da der Anteil des nicht am Lösungsvorgang beteiligten Wassers unter 10% zu liegen scheint (NETTER 1959). Der Wassergehalt der Organe wurde wie folgt bestimmt: die Homogenate wurden 12 Stunden bei 85°C im Trockenschrank gehalten und weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Exsikkator (ca. 10 Torr). Durch Differenzbildung von Feucht- und Trockengewicht errechnete sich der Wassergehalt. Das Volumen der Proteine in den Albumin- und Plasmalösungen ergab sich aus der Konzentration des Proteins mal spezifischen Gewicht. Das durchschnittliche spezifische Gewicht der Plasmaproteine sowie des Albumins wurde mit 1,3 angesetzt (DOCUMENTA-GEIGY 1971). Das so gemessene Proteinvolumen ging in Form eines Korrekturfaktors in die Bindungsberechnung ein.

226 Bestimmung der Eiweißkonzentration

Sie erfolgte mittels der von MERTIN et al. (1971) beschriebenen Biuretmikromethode.

§ Der Albuminanteil der Plasmaproteine wurde elektrophoretisch bestimmt.

227 pH-Bestimmungen

Vor und nach den Dialyse- und Ultrafiltrationsversuchen wurde der pH-Wert in den verschiedenen Lösungen gemessen. Bei Abschluß der Gleichgewichtsdialyse war der pH-Wert in der Zelle, die Plasma enthielt um 0,01 bis 0,2 pH-Einheiten höher als in der Pufferzelle, jedoch nur im pH-Bereich oberhalb von 7,4.

§ Ich danke der Abteilung für klinische Chemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie für die Bestimmung.

Die in den Ergebnissen angegebenen Werte beziehen sich in allen Fällen auf den pH-Wert in der Zelle, die die Proteinlösung enthielt. Während des Ultrafiltrationsvorgangs sinkt der pH-Wert der Proteinlösung um 0,1 bis 0,2 Einheiten, das Ultrafiltrat wurde jedoch alkalischer. Hier wurde der pH-Wert, der zu Beginn der Ultrafiltration vorlag, angegeben.

23 Charakterisierung der Bindung

231 Berechnung des Anteils an gebundener Substanz (B-Wert)

2311 Dialysemethode

Der Konzentration in der Pufferzelle entsprach die Konzentration an freier Substanz (c_f). Die in der Proteinlösung gemessene Konzentration ergab die Totalkonzentration (c_t). Die Konzentration der gebundenen Substanz (c_g) ergab sich aus der Differenz zwischen Totalkonzentration und freier Konzentration. Der gebundene Anteil B ergab sich wie folgt:

$$B = \frac{c_t - c_f}{c_t} \cdot 100 = \left(1 - \frac{c_f}{c_t}\right) \cdot 100 \quad (\% \text{ der Totalkonzentration})$$

Parameter für diese Konzentrationen waren zunächst nur die Zählraten der Radioaktivitätsbestimmung (cpm). Führt man jedoch einen Korrekturfaktor für "quenching" "kQ" ein (siehe 223!), für Volumenzunahme der Proteinlösung infolge kolloidosmotischen Drucks (siehe 221 b!) "kV" und für Volumenanteil des Proteins in der Proteinlösung (siehe 225!) "kP" ein, so errechnet sich der gebundene Anteil B wie folgt:

$$B = \left(1 - \frac{\text{Radioaktivität in der Pufferlösung (cpm)}}{\text{Radioaktivität in der Proteinlösung} \cdot kQ \cdot kV \cdot kP \text{ (cpm)}}\right) \cdot 100 \quad (\% \text{ der Totalkonzentration})$$

2312 Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration entspricht c_t der Substanzkonzentration in der Proteinlösung vor Beginn des Ultrafiltrationsvorgangs, c_f der Konzentration im Ultrafiltrat. Der Korrekturfaktor "kV" entfällt hier.

Als gebundener B ergibt sich:

$$B = \left(1 - \frac{c_f}{c_t}\right) \cdot 100 =$$

$$(1 - \frac{\text{Radioaktivität im Ultrafiltrat (cpm)}}{\text{Radioaktivität in der Proteinlösung, kQ kP (cpm)}})$$

• 100 (% der Totalkonzentration)

Die rechnerische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels entsprechender Programme auf einer Combitron XX (DIEHL RECHENSYSTEME).

232 Bestimmung von Bindungsparametern nach SCATCHARD

Zur genaueren Charakterisierung der Bindung genügt die Angabe der gebundenen Fraktion im allgemeinen nicht, da sie sich nur auf eine ganz bestimmte Gesamtkonzentration bezieht. Die Beschreibung der Bindung in Abhängigkeit von der Konzentration an Substanz und Protein verlangt eine kompliziertere Art der Darstellung. Sie kann erfolgen unter Zuhilfenahme der LANGMUIR'schen oder FREUNDLICH'schen Adsorptionsisotherme (sie liegt z.B. dem von SCHOLTAN (1964) gewählten doppelt logarithmischen Ordinatensystem zugrunde, in dem c_g gegen c_f aufgetragen wird) oder durch Darstellungsformen, wie sie sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten lassen. Wir haben hier dem Vorschlag SCATCHARDS (1949) entsprechend eine auf dem Massenwirkungsgesetz beruhende Darstellungsform gewählt, die für den Fall gilt, daß ein Proteinmolekül n Moleküle der angegebenen Substanz bindet:

$$\frac{c_g}{n \cdot c_{pf} \cdot c_f} = k;$$

$$\frac{c_g}{(n \cdot c_{pt} - c_g) c_f} = k;$$

$$\frac{c_g}{c_f} = n \cdot k \cdot c_{pt} - k \cdot c_g; \quad (1)$$

$$\frac{c_g}{c_f \cdot c_{pt}} = n \cdot k - \frac{k \cdot c_g}{c_{pt}}; \quad \text{für } \frac{c_g}{c_{pt}} = r \quad \text{folgt:}$$

$$\frac{r}{c_f} = n \cdot k - k \cdot r \quad (2)$$

Hierbei ist:

c_g Konzentration an gebundenem Pharmakon

- c_f Konzentration an freiem Pharmakon
 c_{pf} Konzentration an nicht an das Pharmakon gebundenen Protein
 c_{pt} Gesamtkonzentration des Proteins
 n Anzahl der Bindungsstellen pro Molekül Protein
 k Assoziationskonstante der Pharmakon-Protein-Bindungsreaktion
 $n \cdot k$ Gesamtbindungskonstante der Bindungsreaktion
 r Anzahl der pro Molekül Protein gebundenen Substanzmoleküle

Die Gleichungen gelten allerdings nur für den einfachen Fall, daß

1. nur ein Ligand vorliegt;
2. nur ein Proteintyp mit bekanntem Molekulargewicht vorliegt und
3. nur ein einziger Typ von Bindungsstellen vorhanden ist.

Zur Bestimmung von r wurde die molare Konzentration an gebundener Substanz benötigt. Dementsprechend wurden die Radioaktivitäten (cpm) entsprechend der internen Standardisierung mit einem Umrechnungsfaktor (kU) multipliziert. r ergibt sich als Verhältnis der molaren Konzentration der gebundenen Substanz zur molaren Konzentration des Proteins:

$$r = \frac{c_t - c_f}{c_{pt}} = \frac{\text{Radioakt. in der Proteinlösung (cpm)} \cdot kQ \cdot kP \cdot kV \cdot kU}{\text{Konzentration des Proteins (Mol/l)}} -$$

$$\frac{\text{Radioakt. im Puffer (cpm)} \cdot kU}{\text{Konzentration des Proteins (Mol/l)}} \left(\frac{1}{\text{Mol}} \right)$$

Trägt man nun r/c_f gegen r in einem Koordinatensystem auf, so ergibt die graphische Darstellung, wenn die vorher genannten Bedingungen erfüllt sind, eine Gerade (siehe Abbildung 5).

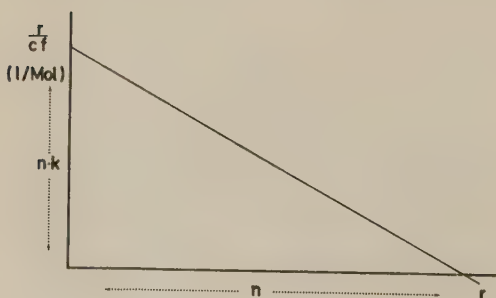


Abb. 5

Schematische Darstellung eines SCATCHARD-Diagramms. Erklärung siehe Text!

Ihr Schnittpunkt mit der Ordinate (für $r \longrightarrow 0$) ergibt die Gesamtbindungskonstante $n \cdot k$; aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse (für $r/c_f \longrightarrow 0$) ergibt sich die Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül n . Die Neigung der Geraden entspricht der Assoziationskonstante k .

Liegen mehrere von einander unabhängige Bindungsstellengruppen mit unterschiedlicher Assoziationskonstante vor, so erhält man im SCATCHARD-Diagramm keine Gerade mehr. Die zugrunde liegende Gesetzmäßigkeit kann nach der Theorie der multiplen Gleichgewichtskonstanten durch folgende allgemeine Gleichung beschrieben werden (KLOTZ und HUNSTON 1971):

$$\frac{r}{c_f} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i}{1 + k_i c_f} \quad (3)$$

Hierbei ist m die Anzahl der voneinander unabhängigen Bindungsstellengruppen.

233 Bestimmung von Bindungsparametern nach ROSENTHAL (1967)

Falls bei einer Bindungsreaktion Typ und Molekulargewicht des bindenden Proteins bzw. der Proteine nicht bekannt sind, stößt die Bestimmung der Bindungsparameter nach dem SCATCHARD-Diagramm auf Schwierigkeiten: Von ROSENTHAL (1967) wird daher ein graphisches System empfohlen, das dem SCATCHARD-Diagramm sehr ähnlich ist. Nur wird hier statt " r/c_f " " c_g/c_f " und statt " r " " c_g " als Ordinaten bzw. Abszisseneinheit verwendet, da dieser graphischen Darstellung die Gleichung (1) zugrunde liegt. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt $n \cdot k \cdot c_{pt}$, der mit der Abszisse $n \cdot c_{pt}$. Die Steigung der Geraden zeigt jedoch wie im Diagramm nach SCATCHARD die Assoziationskonstante k der Bindungsreaktion an.

234 Bestimmung der thermodynamischen Parameter

Aus den mittels des SCATCHARD-Diagramms erhaltenen Bindungskonstanten lassen sich die thermodynamischen Größen der Bindungsreaktionen berechnen; als Bindungsparameter wurde nach dem Vorschlag SCHOLTANS (1964) die Gesamtbindungskonstante $n \cdot k$ (von SCHOLTAN K_1 genannt) verwendet.

Die freie Energie (Δ_F) der Bindungsreaktion folgt der Gleichung:

$$\Delta_F = - R \cdot T \cdot \ln n \cdot k = - R \cdot T \cdot \ln K_1 \quad \left(\frac{\text{cal}}{\text{Mol}} \right) \quad (4)$$

wobei: R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur

K_1 = Assoziationskonstante der Bindungsreaktion bezogen auf die molare Konzentration an Proteinmolekülen.

Werden bei zwei Temperaturen die Werte für K_1 bestimmt, so lassen sich auch die Enthalpie und die Entropie der Bindungsreaktionen bestimmen - für den Fall, daß in diesem Temperaturbereich die Enthalpie unabhängig von der Temperatur ist.

Die Enthalpie (Δ_H) berechnet sich nach der Gleichung:

$$\Delta_H = - \frac{d \ln K_1}{d \left(\frac{1}{T} \right)} \cdot R = \frac{- \ln K_1(T_1) - \ln K_1(T_2)}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \cdot R \quad \left(\frac{\text{cal}}{\text{Mol}} \right) \quad (5)$$

Die Entropie (Δ_S) ergibt sich nach:

$$\Delta_S = \frac{\Delta_H - \Delta_F}{T} \quad \left(\frac{\text{cal}}{\text{Mol} \cdot ^\circ\text{K}} \right) \quad (6)$$

3 ERGEBNISSE

31 Bindung an Plasmaproteine

311 Bindung an Albumin und Plasma

Tabelle 3 gibt die Bindungen der vier untersuchten Substanzen an Humanplasma, Humanserumalbumin und Kaninchenplasma wieder.

	Humanplasma	Humanalbumin	Kaninchenplasma
Dihydro-morphin	13,9 $\pm$ 2,4	7,0 $\pm$ 3,6	15,7 $\pm$ 1,5
Morphin	23,4 $\pm$ 1,1	26,0 $\pm$ 0,4	27,0 $\pm$ 0,5
Fentanyl	69,5 $\pm$ 0,2	65,8 $\pm$ 1,2	67,1 $\pm$ 0,5
Etorphin	87,9 $\pm$ 0,2	50,7 $\pm$ 0,5	69,0 $\pm$ 0,3

Tab. 3 Prozentsatz an gebundener Substanz (β -Werte) an Humanplasma, Humanalbumin und Kaninchenplasma bei 37°C, pH 7,4; $c_f = 10^{-7}$ Mol/l; Bestimmung mittels Gleichgewichtsdialyse; Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier bis sechs Versuchen.

Die lipophilen Verbindungen Etorphin und Fentanyl werden in allen drei Medien stärker gebunden als die hydrophilen Pharmaka Morphin und Dihydromorphin. Es bestehen bei den einzelnen Substanzen nur geringe Unterschiede zwischen den Bindungen in den drei Proteinlösungen. Nur Etorphin macht eine Ausnahme: seine Bindung im Humanplasma ist weit höher als im Humanalbumin (die hier gewählte Albuminkonzentration entspricht der im Humanplasma vorliegenden Albuminkonzentration von 4,8 g%).

312 Albuminbindung in der Darstellung nach SCATCHARD

Abbildung 6 zeigt die Bindung der vier Substanzen an Albumin in der Darstellung nach SCATCHARD; die Proteinkonzentration wurde hierbei konstant gehalten und die Substanzkonzentration variiert. Die Beziehung zwischen r/c_f und r ergibt im SCATCHARD-Diagramm eine Gerade, die nicht nur die Ordinate, sondern auch die Abszisse schneidet (siehe Methodik 232!), wenn die Sub-

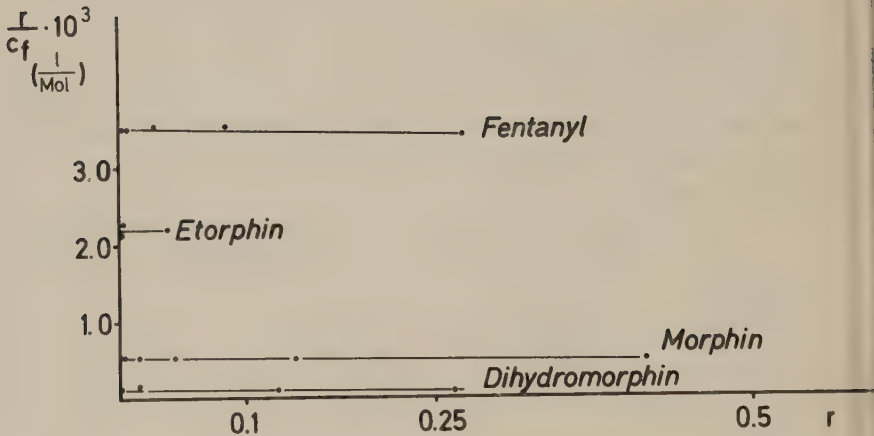


Abb. 6 SCATCHARD-Diagramm (siehe Methodik 232!) der Bindung der vier Analgetika an Humanalbumin bei pH 7,4 und 37°C; Konzentration des Albumin: Bei Fentanyl und Etorphin: 1 g%; bei Morphin und Dihydromorphen: 5 g%; Bestimmung mittels Gleichgewichtsdialyse; Mittelwerte aus 3 bis 4 Versuchen.

	$n \cdot k$ (l/Mol)	k (l/Mol)	n
Dihydromorphen	127	(-127)	(1)
Morphin	533	(-125)	(4)
Fentanyl	3 483	(-131)	(27)
Etorphin	2 204	Ø	Ø

Tab. 4 Bindungsparameter nach SCATCHARD
 $n \cdot k$ = Gesamtbindungskonstante, n = Anzahl der Bindungsstellen pro Molekül Albumin, k = Assoziationskonstante der Bindungsreaktion.

stanzkonzentration so hoch wird, daß alle Bindungsstellen besetzt sind. Das hier gezeigte SCATCHARD-Diagramm gibt nur den für kleine Substanzkonzentrationen geltenden Bereich der Bindungscharakteristik wieder: In diesem Bereich verlaufen die Geraden nahezu parallel zur Abszisse, d.h. die Substanzkonzentration ist in diesem Bereich sehr klein gegenüber der Konzentration an Bindungsstellen. Bei Einsetzen höherer Substanzkonzentrationen bei konstanter Albuminkonzentration fielen die Substanzen aus der Lösung aus; bei Einsetzen kleinerer Albuminkonzentrationen wurden die Bestimmungen zu ungenau. Die Bestimmungen erfaßten also den pharmakologisch relevanten Bereich der Substanzkonzentrationen.

In Tabelle 4 sind die aus diesem Diagramm ermittelten Bindungsparameter aufgeführt. Da die Geraden fast parallel zur Abszisse verlaufen, sind die durch Extrapolation der Geraden gewonnenen Abszissenschnittpunkte (n) sowie deren Steigungen (k) mit einem größeren Streuungsfehler behaftet. Die betreffenden Werte sind daher in Klammern gesetzt. Für Etorphin, daß sich im Phosphatpuffer bei pH 7,4 nur bis zu einer Konzentration von etwa 20 $\mu\text{g/ml}$ löste, war auch eine näherungsweise Extrapolation nicht möglich.

Die durch den Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate exakt festzulegenden Werte der Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$, können auch dazu verwendet werden, die freien Energien der einzelnen Bindungsreaktionen zu beschreiben (siehe Tabelle 7, Abschnitt 333).

Abbildung 7 beschreibt die Abhängigkeit der Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$ der Fentanyl-Albuminbindungsreaktion von der Konzentration des Albumins. Mit steigender Konzentration des Albumins verringerte sich der Wert der Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$.

313 Plasmabindung in der Darstellung nach ROSENTHAL

Um die Bindung - wie im SCATCHARD-Diagramm dargestellt - an Albumin mit der Bindung an Plasma vergleichen zu können, wurde ein von ROSENTHAL (1957) vorgeschlagenes Darstellungssystem verwendet. In Abbildung 8 sind die mit Albumin als auch die mit Plasma erhaltenen Bindungsdaten für Morphin und Fentanyl aufgetragen. Dabei werden Unterschiede in den Bindungscharakteristiken zwischen Albumin und Plasma deutlich: Bei Plasma geht die Gerade im Bereich sehr kleiner c_g -Werte in eine Krümmung über (deutlich bei Fentanyl). Dieses Abweichen von der linearen Be-

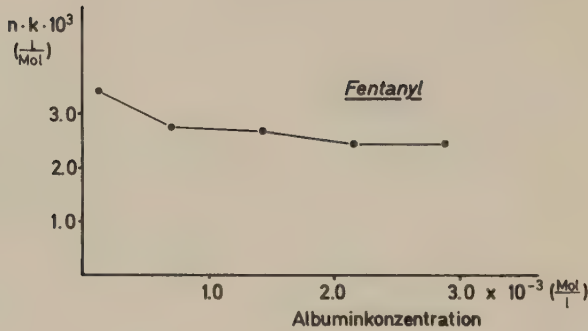


Abb. 7 Beziehung zwischen Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$ und Albuminkonzentration. Bindungsbestimmung mittels Gleichgewichtsdialyse bei 37°C und pH 7,4; ($c_t = 10^{-7} \text{ Mol/l}$); Mittelwerte aus 3 bis 4 Versuchen.

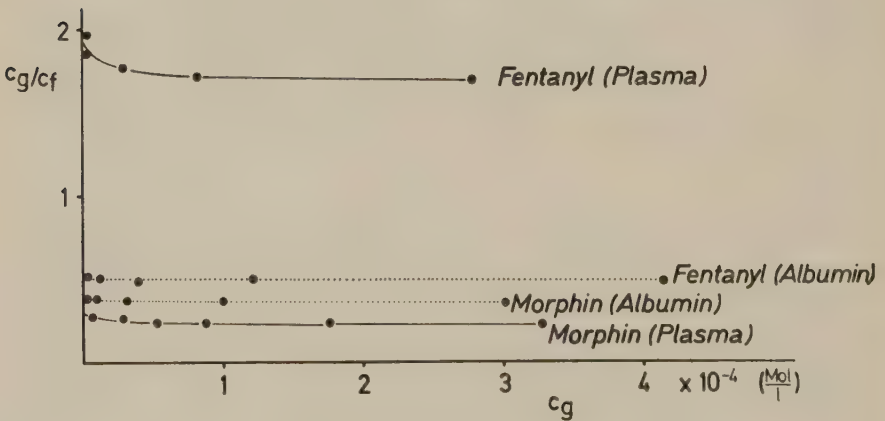


Abb. 8 Bindung von Morphin und Fentanyl an Humanalbumin und Kaninchenplasma im Diagramm nach ROSENTHAL. Bindungsbestimmung mittels Gleichgewichtsdialyse bei 37°C , pH 7,4; Albuminkonzentration wie in Abbildung 6; Mittelwerte aus 3 bis 4 Versuchen.

ziehung spricht dafür, daß hier im Gegensatz zum Albumin zwei oder mehr Bindungsstellengruppen mit unterschiedlichen Affinitäten existieren, wobei eine Bindungsstellengruppe im Bereich kleiner Konzentrationen c_g abgesättigt wird.

32 Bindung in Gewebshomogenaten

321 Bindung an Homogenate (B -Wert)

Die Ergebnisse der Bindung an Homogenate sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Das Verhältnis von Gewebsgewicht zu dem Gesamtvolumen des Homogenats (g/V) ist für alle Homogenate 0,25. Die vier Substanzen sind an alle Homogenate und an Plasma in der gleichen Abstufung gebunden. Die Bindung der einzelnen Substanz an die verschiedenen Homogenate ist dabei etwa gleich. Besonders ausgeprägt scheint die Bindung der lipophilen Substanzen Fentanyl und Etorphin an Leberhomogenat zu sein. Die hydrophilen Substanzen Dihydromorphin und Morphin werden am stärksten an Gehirnhomogenat gebunden.

	Gehirn	Leber	Niere	Lunge
Dihydromorphin	12,6 $\pm$ 4,0	6,9 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,8	6,2 $\pm$ 1,1
Morphin	18,0 $\pm$ 3,2	16,6 $\pm$ 2,2	14,2 $\pm$ 3,5	13,2 $\pm$ 0,3
Fentanyl	69,0 $\pm$ 2,3	82,0 $\pm$ 1,9	72,0 $\pm$ 1,8	71,3 $\pm$ 1,1
Etorphin	74,7 $\pm$ 1,0	80,5 $\pm$ 2,0	76,2 $\pm$ 1,9	76,1 $\pm$ 2,0

Tab. 5 Bindung der vier Analgetika in Prozent der Totalkonzentration ($c_t = 10^{-7}$) an Homogenate von Gehirn, Leber, Niere und Lunge von Kaninchen (B -Werte). Bindungsbestimmung mittels Ultrafiltration bei 37°C und pH 7,4 mit Homogenatkonzentrationen (g/V) = 0,25; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 bis 6 Versuchen.

322 Morphin-Gehirnhomogenat-Bindung in der Darstellung nach ROSENTHAL

Um Aussagen über eine eventuell sättigbare Anzahl von Bindungs-

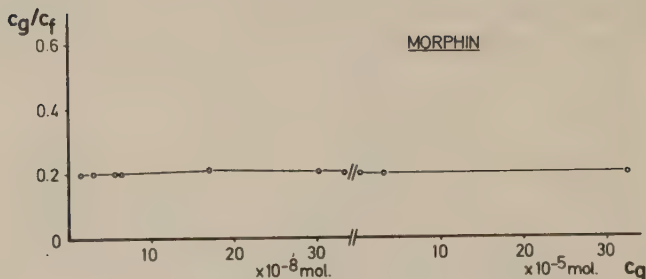


Abb. 9 Bindung von Morphin an Gehirnhomogenat ($g/V = 0,25$) bei Morphinkonzentrationen zwischen 10^{-8} und 10^{-4} Mol/l im ROSENTHAL-Diagramm; Bindungsbestimmung bei 37°C und pH 7,4 mittels Gleichgewichtsdialyse; Mittelwerte aus 6 Versuchen.

stellen im Gehirnhomogenat machen zu können, wurde die Bindung von Morphin an Gehirnhomogenat bei unterschiedlichen Morphinkonzentrationen gemessen und die Ergebnisse nach dem ROSENTHAL-Plot aufgetragen (Abbildung 9).

Geht man von einer größeren Anzahl von Bindungsstellen aus, deren Besetzung im SCATCHARD-Plot durch eine Gerade repräsentiert wird, so kann man bei Sättigung einer vergleichsweise kleineren Bindungsstellengruppe ein Abbiegen dieser Geraden im Sinne eines steileren Verlaufs im Bereich kleiner c_g -Werte erwarten. Interessant ist eine solche Fragestellung im Hinblick auf die mögliche Identität solch absättigbarer Bindungsstellen mit spezifischen Rezeptoren im Gehirn. Da allerdings auch unspezifische Bindungsstellen eine solche Sättigungscharakteristik zeigen können, sind solche Bindungsphänomene durch geeignete Substanzen auf Spezifität zu prüfen; von optischen Antipoden wird z.B. angenommen, daß sie gleiche Affinität zu unspezifischen, jedoch unterschiedliche Affinität zu spezifischen Bindungsstellen der untersuchten Pharmaka besitzen (GOLDSTEIN 1971).

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß die Bindung von Morphin an Gehirnhomogenat keine Sättigung zeigt, obwohl der Konzentrationsbereich sehr groß gewählt wurde (fünf Zehnerpotenzen) und bereits bei sehr kleinen Konzentrationen beginnt (10^{-8} Mol/l).

Das deutet darauf hin, daß die Konzentration spezifischer Bindungsstellen zu gering ist, um sich von der im untersuchten Bereich praktisch nicht sättigbaren Konzentration an unspezifischen Bindungsstellen zu unterscheiden; eine Zerstörung der spezifischen Bindungsstellen bei Homogenisation des Gehirngewebes ist ebenfalls nicht auszuschließen.

323 Extrapolation auf die Bindung an unverdünnte Homogenate
Um von der Bindung verdünnter Homogenate auf die Bindung unverdünnter Homogenate schließen zu können, haben GILETTE (1965) und SCHANKER und MORRISON (1965) graphische Darstellungsweisen entwickelt, die solche Extrapolationen ermöglichen. Diese Diagramme beruhen auf einer Vereinfachung der dem ROSENTHAL-Plot zugrunde liegenden Gleichung (1):

$$\frac{c_g}{c_f} = n \cdot k \cdot c_{pt} - c_g \cdot k \quad (1)$$

Für den Fall, daß $n \cdot c_{pt}$ - die Anzahl der Bindungsstellen - sehr viel größer als c_g ist (wovon man im vorliegenden Fall offenbar ausgehen kann, da ja keine Sättigung erreicht wurde (siehe Abbildung 9)), fällt das Glied der Gleichung $k \cdot c_g$ als vernachlässigbar weg. So ergibt sich:

$$\frac{c_g}{c_f} = n \cdot k \cdot c_{pt} \quad (7)$$

Durch Einführen des Homogenatverdünnungsfaktors g/V erhält man:

$$\frac{c_g}{c_f} = n \cdot k \cdot c_{pt} \cdot \frac{g}{V} \quad (8)$$

Durch Umformung der Gleichung (8) ergibt sich nach SCHANKER und MORRISON:

$$\frac{c_f}{c_g} = \frac{1}{n \cdot k \cdot c_{pt}} \cdot \frac{V}{g} \quad (9)$$

Hierbei bedeutet:

c_g : Konzentration an gebundener Substanz; c_f : Konzentration an freier Substanz; $n \cdot k$: Gesamtbindungskonstante der Substanz-Homogenatbindung; g : Gewicht des Gewebsanteils des Homogenats; V : Volumen des Homogenats.

Für solch komplexe Bindungssysteme wie die hier untersuchten Homogenate stellen die erwähnten Gleichungen Vereinfachungen dar: Eine lineare Beziehung zwischen c_f/c_g und V/g ergibt sich nur unter der Voraussetzung, daß sich die Bindungskonstante $n \cdot k$ in dem Bereich, in dem die Konzentration variiert wird, nicht ändert. Abbildung 10 zeigt für Pentanyl eine lineare Beziehung zwischen dem Quotienten c_f/c_g und dem Homogenatverdünnungsfaktor g/V bei verschiedenen Verdünnungen von Gehirn- und Leberhomogenat. Das bedeutet, daß die Änderung der Homogenatkonzentrationen keinen nennenswerten Einfluß auf die Gesamtbindungskonstante $n \cdot k$ hat. Diese lineare Beziehung zeigt auch, daß die Anzahl der Bindungsstellen in den hier hergestellten Homogenatkonzentrationen so groß ist, daß das Glied $c_g \cdot k$ der Gleichung (1) - wie oben gefordert - tatsächlich vernachlässigbar ist. Das erlaubt daher den Versuch einer Extrapolation auf unverdünntes Homogenat ($V/g = 1$). Durch Umrechnung der dabei erhaltenen Werte bekommt man gebundene Fraktionen in der Größenordnung von 90%.

324 Vergleich der in vitro gemessenen Gewebsbindung mit den in vivo erhaltenen Gewebskonzentrationen

Kennt man also die Bindung an unverdünntes Homogenat und die an Plasma, so läßt sich daraus auf das Verhältnis der Konzentration im Plasma zur Konzentration im Gewebe schließen. In Übereinstimmung mit BRODIE und HOGGEN (1957) und FIREMARK et al. (1963) ist dies möglich unter der Annahme, daß im Gleichgewicht die Konzentration der freien Substanz im Plasma gleich der Konzentration der freien Substanz in den Geweben ist. Bezeichnet man - analog zum B-Wert - α als Prozentsatz an nicht gebundener Substanz, so gilt:

$$c_f \text{ Plasma} / c_t \text{ Plasma} = \alpha_{\text{Plasma}}; \quad c_t \text{ Plasma} = c_f \text{ Plasma} / \alpha_{\text{Plasma}}$$

$$c_f \text{ Gewebe} / c_t \text{ Gewebe} = \alpha_{\text{Gewebe}}; \quad c_t \text{ Gewebe} = c_f \text{ Gewebe} / \alpha_{\text{Gewebe}}$$

daraus folgt also für $c_f \text{ Gewebe} = c_f \text{ Plasma}$:

$$c_t \text{ Gewebe} / c_t \text{ Plasma} = \alpha_{\text{Plasma}} / \alpha_{\text{Gewebe}} \quad (10)$$

In Abbildung 11 werden einige Quotienten Konzentration im Gewebe / Konzentration im Plasma, wie sie einerseits auf Grund von

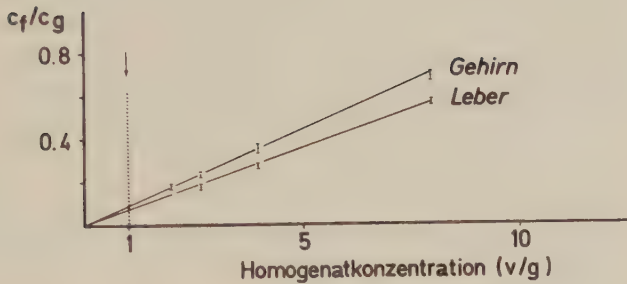


Abb. 10 Bindung von Fentanyl an Leber- und Gehirnhomogenat von Kaninchen im SCHANKER-MORRISON-Plot. Bindungsbestimmung bei pH 7,4 und 37°C mittels Gleichgewichtsdialyse ($c_t = 10^{-7}$ Mol/l); B-Werte für V/g = 1: Leber: 93,3%, Gehirn: 91,6%; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen.

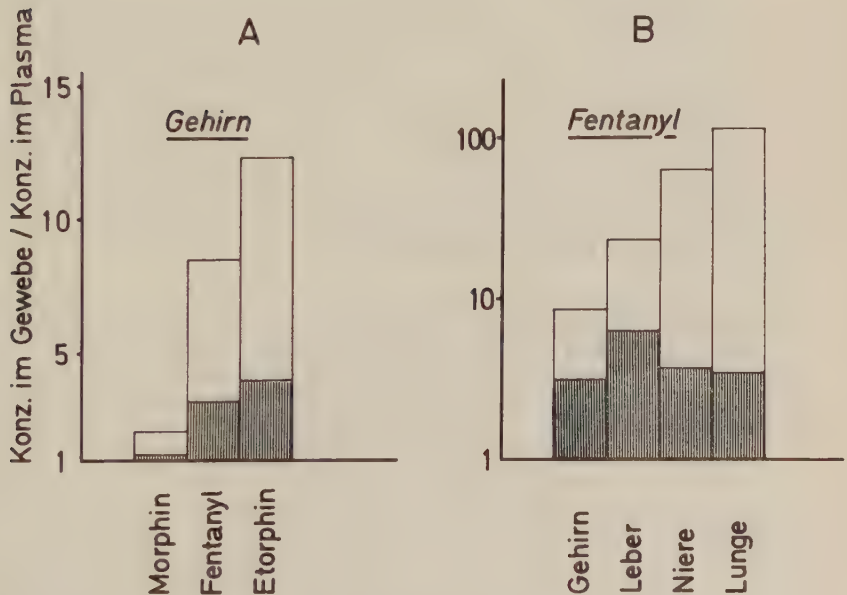


Abb. 11 Verhältnis der Konzentration im Gewebe zur Konzentration im Plasma:
 A) bei Morphin, Fentanyl und Etorphin im Fall des Quotienten Konzentration Gehirn/Konzentration Plasma
 B) bei Fentanyl im Fall verschiedener Organe
 auf der Basis von Homogenatbindungen berechnet
 60 Minuten nach i.v. Injektion bestimmt

Bindungswerten berechnet, andererseits in Untersuchungen von HER et al. (1971) und TESCHEMACHER (persönliche Mitteilung) direkt gemessen wurden, miteinander verglichen. Für die untersuchten Substanzen stufen sich die mittels der Bindung kalkulierten Konzentrationen im Gehirn genauso ab, wie die tatsächlich gemessenen Konzentrationen. Dagegen stimmen - was die Abstufung anbelangt - die in Verteilungsstudien in den Organen gemessenen Fentanylkonzentrationen (HER et al. 1971) nicht mit den auf Grund der Bindungen zu erwartenden Konzentrationen überein. Besonders die hohe Lungenkonzentration kann dadurch nicht erklärt werden.

33 Die hydrophobe Wechselwirkung als vorherrschender Bindungstyp

Alle bisher dargestellten Bindungen wurden unter folgenden Standardbedingungen gemessen: 37°C ; pH 7,4; 0,13 molarer Phosphatpuffer. Sie sollten die Verhältnisse, wie sie in vivo vorliegen, möglichst genau wiedergeben. Die Veränderungen dieser Parameter ermöglichen es, einen gewissen Einblick in die Natur der Interaktion morphinartiger Analgetika mit den untersuchten Proteinen zu gewinnen. Die Wechselwirkung eines Pharmakons mit Biopolymeren wird von verschiedenen zwischenmolekularen Kräften bestimmt. Die wichtigsten Bindungsarten sind: die Ionenbindung, die Wasserstoffbindung und die van der Waalsche Bindung. Eine "Bindungsform von besonderer Bedeutung ist ferner die hydrophobe Wechselwirkung (siehe Einleitung).

331 Beziehung zwischen Bindung und Verteilungskoeffizient

Die Bindung apolarer Liganden an Proteine erfolgt ebenso im Sinne einer hydrophoben Wechselwirkung wie die Verteilung einer unpolaren Substanz zwischen Wasser und einem weniger polaren Lösungsmittel. Daher kann der Vergleich zwischen Proteinbindung und Verteilungskoeffizient direkt darüber Aufschluß geben, inwieweit eine hydrophobe Wechselwirkung in den Bindungsmechanismus involviert ist.

In Anlehnung an BIRD und MARSHALL (1967) ist in Abbildung 12 für die vier Substanzen der Logarithmus des Quotienten c_g/c_f (Bindung an Kaninchenplasma) gegen den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten Oktanol/ H_2O aufgetragen. Für 37°C wie für 3°C ergibt sich dabei eine lineare Beziehung für die Substanzen ähnlicher Struktur Dihydromorphin, Morphin und Etorphin. Der

Wert für Fentanyl fällt infolge dessen stark vom Morphintyp abweichenden Konstitution aus dieser Beziehung heraus; ein Zeichen dafür, daß der Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser nur ein stark vergrößerndes Modell der betrachteten Bindung darstellt. Die unterschiedliche Bindung bei 3° bzw. 37°C spricht ebenfalls für eine hydrophobe Wechselwirkung (siehe später).

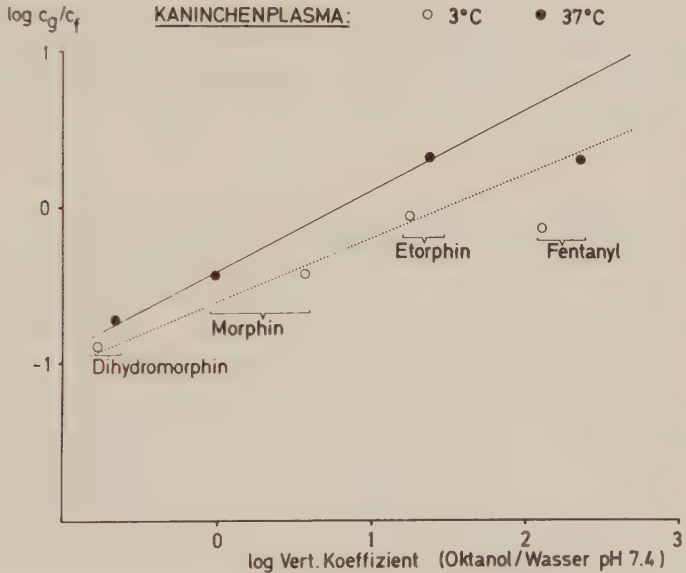


Abb. 12 Beziehung zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten Oktanol/0,13 molaren Phosphatpuffer bei pH 7,4 und dem Quotienten c_g/c_f ; Bindungsbestimmungen bei 3° bzw. 37°C und pH 7,4 mittels Gleichgewichtsdialyse ($c_t = 10^{-7}$ Mol/l); Mittelwerte aus 5 Versuchen.

332 Abhängigkeit der Bindung von der Elektrolytkonzentration
Im Wasser gelöste Elektrolyte verstärken die hydrophobe Wechselwirkung, da sie die Löslichkeit apolarer Substanzen im Wasser herabsetzen (KAUZMANN 1959). Umgekehrt schwächt im Falle einer Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindung eine Erhöhung der Elektrolytkonzentrationen durch Puffer mit höherer Ionenstärke die Bindung ab, da die elektrostatische Anziehungskraft der

geladenen Aminosäurereste des Proteins auf die Substanzen weniger stark zum Tragen kommt (KAUZMANN 1959, SCHOLTAN 1964, WEDER und BICKEL 1970). Abbildung 13 zeigt die Bindungen von Morphin und Fentanyl an mit Phosphatpuffer verdünntes Kaninchenplasma. Wird dem Plasma 0,13 molarer Phosphatpuffer (Ionenstärke bei pH 8,6 = 0,39) zugesetzt, so erhält man die gleiche Bindung wie bei Zugabe von Plasma-Ultrfiltrat (siehe auch Tabelle 1). Zusetzen einer 0,65 molaren Phosphatpufferlösung (Ionenstärke bei pH 8,6 = 1,95) führt jedoch zu einer Erhöhung der Plasmabindung; dies ist für eine hydrophobe Wechselwirkung charakteristisch.

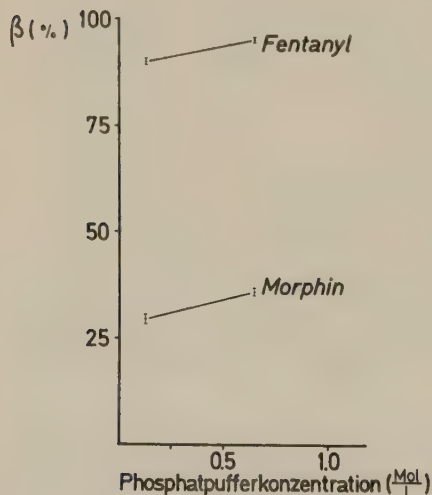


Abb. 13

Bindung (β -Werte) von Fentanyl und Morphin an Kaninchenplasma bei pH 8,6 und 37°C ($c_p = 10^{-7}$ Mol/l) in Abhängigkeit von der Konzentration des Phosphatpuffers (Verdünnung mit Plasma im Verhältnis 1:1); Ultrafiltrationsmethode; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Versuchen.

333 Temperaturabhängigkeit der Bindung

Thermodynamisch gesehen ist die hydrophobe Wechselwirkung ein entropisch gesteuerter Vorgang. Die Bindungsenthalpie ist sogar positiv, d.h. die Bindungsreaktion selbst ist ein endothermer Prozeß. Auf Grund dieser thermodynamischen Gesetzmäßigkeit erklärt sich, daß die hydrophobe Wechselwirkung innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs mit steigender Temperatur zunimmt (KAUZMANN 1959, NEMETHY 1967).

In Tabelle 6 sind die Bindungen der vier Substanzen bei zwei

	Humanalbumin		Kaninchenplasma	
	3° C	37° C	3° C	37° C
Dihydro-morphin	6,6 $\pm$ 2,2	7,0 $\pm$ 3,6	12,0 $\pm$ 1,0	15,7 $\pm$ 1,5
Morphin	17,0 $\pm$ 2,4	26,0 $\pm$ 0,4	27,8 $\pm$ 0,5	27,0 $\pm$ 0,5
Fentanyl	48,4 $\pm$ 1,0	65,8 $\pm$ 1,2	43,2 $\pm$ 2,2	67,1 $\pm$ 0,5
Etorphin	31,3 $\pm$ 2,6	50,7 $\pm$ 0,5	47,3 $\pm$ 1,3	69,0 $\pm$ 0,2

	Gehirnhomogenat		Nierenhomogenat	
	3° C	37° C	3° C	37° C
Dihydro-morphin	10,8 $\pm$ 2,4	12,6 $\pm$ 4,0	14,4 $\pm$ 2,6	5,1 $\pm$ 0,8
Morphin	18,7 $\pm$ 1,8	18,0 $\pm$ 3,1	22,6 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 3,5
Fentanyl	55,7 $\pm$ 3,1	69,0 $\pm$ 2,3	59,3 $\pm$ 3,4	72,0 $\pm$ 1,8
Etorphin	54,8 $\pm$ 2,9	74,7 $\pm$ 1,0	66,8 $\pm$ 3,9	76,2 $\pm$ 1,9

Tab. 6 Bindungen (B-Werte) der 4 untersuchten Analgetika an Plasmaproteine und Homogenate bei 3° C und 37° C; Bindungsbestimmung bei pH 7,4 ($ct = 10^{-7}$ mol.) mittels Gleichgewichtsdialyse (Humanalbumin, Kaninchenplasma) und Ultrafiltration (Gehirnhomogenat und Nierenhomogenat von Kaninchen); Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 bis 6 Versuchen.

Temperaturen (3° und 37°C) in verschiedenen Proteinlösungen aufgetragen. Die Bindung bei 37°C ist in fast allen Fällen höher als bei 3°C ; besonders auffällig ist diese Beziehung bei den lipophilen Substanzen Fentanyl und Etorphin, da bei diesen Substanzen die hydrophobe Wechselwirkung ja besonders ausgeprägt ist. Bei den hydrophilen Substanzen Dihydromorphin und Morphin sind in einigen Fällen Inversionen, d.h. höhere Bindungen bei niedriger Temperatur zu beobachten; dies weist auf die Möglichkeit eines zusätzlichen Bindungstyps hin, der bei denjenigen Substanzen mehr zum Tragen kommt, bei denen die hydrophobe Wechselwirkung nicht so ausgeprägt ist: Im Falle von Ionenbindungen z.B. findet sich häufig eine geringgradige Erhöhung der Bindung bei niedrigen Temperaturen (CHO et al. 1971).

Für die Bindung an 5 prozentiges Albumin sind in Tabelle 7 die thermodynamischen Parameter der Bindungsreaktionen der einzelnen Substanzen aufgetragen. Die Berechnung erfolgte mittels der bei 3° und 37°C bestimmten Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$ (SCHOLTAN 1964); sie hat zur Voraussetzung, daß sich die Enthalpie der Bindungsreaktion im untersuchten Temperaturbereich nicht ändert (siehe Methodik 234).

	$\Delta_F 3^{\circ}\text{C}$ cal/Mol	$\Delta_F 37^{\circ}\text{C}$ cal/Mol	Δ_H cal/Mol	Δ_S cal/Mol $^{\circ}\text{K}$
Dihydromorphin	- 2522	- 2879	+ 375	+ 10,5
Morphin	- 3108	- 3822	+ 2686	+ 21,0
Fentanyl	- 3938	- 4865	+ 3587	+ 27,3
Etorphin	- 3544	- 4481	+ 4065	+ 27,6

Tab. 7 Freie Energie Δ_F bei 3° und 37°C , Enthalpie Δ_H und Entropie Δ_S der Bindungsreaktionen der vier Analgetika mit Humanalbumin; Bindungsbestimmung bei pH 7,4 mittels Gleichgewichtsdialyse.

Der hohe Betrag an freier Energie Δ_F , auf Grund dessen die Reaktion abläuft, leitet sich bei allen vier Substanzen aus der Entropie Δ_S ab, welche mit negativen Vorzeichen - mit der Temperatur multipliziert - in die Berechnung eingeht. Die Bindungsenthalpie Δ_H ist in allen Fällen stark positiv.

34 Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert

Die bisher gezeigten Befunde charakterisieren die Bindung der Substanzen als hydrophobe Wechselwirkung, weisen jedoch in geringem Umfang auch auf die Möglichkeit anderer Bindungsmechanismen hin. Durch Verschiebung des pH wurde nun untersucht, inwieweit ionale Bindungsmechanismen eine Rolle spielen könnten; dazu wurden die Bindungen bei pH-Werten bestimmt, bei denen die Substanzen vollständig ionisiert waren. Bindungsbestimmungen über den gesamten pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 erlaubten darüber hinaus Aufschluß darüber, in welcher Weise die Bindung durch die pH-Verschiebung beeinflusst wurde.

341 Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten vom pH der wässrigen Phase

Wie schon in 331 gezeigt wurde, kann die Verteilung von Substanzen zwischen einer wässrigen und einer Lipoidphase als Modell für die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Substanzen und Proteinen angesehen werden. Bei pH 7,4 liegen zwei Substanzen in wässriger Lösung vor, die ionisierte Form und die freie Base; die pK-Werte der hier untersuchten Substanzen liegen zwischen 7,0 und 9,25 (siehe Abbildung 1). Der Verteilungskoeffizient bei einem bestimmten pH-Wert setzt sich daher zusammen aus dem Verteilungskoeffizienten der freien Base und dem Verteilungskoeffizienten der ionisierten Form. Unter der Voraussetzung, daß die Konzentration an H^+ -Ionen nur den Ionisationsgrad der Substanz, nicht aber die Eigenschaften der beiden Phasen beeinflusst, läßt sich folgende Gleichung aufstellen:

$$V_{k_t} = \frac{\text{Konz.}_i (\text{Lip}) + \text{Konz.}_b (\text{Lip})}{\text{Konz.}_i (H_2O) + \text{Konz.}_b (H_2O)} =$$

$$\frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \cdot V_{k_i} + \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} \cdot V_{k_b} \quad (11)$$

Hierbei ist:

V_{k_t} : Bruttoverteilungskoeffizient; V_{k_i} : Verteilungskoeffizient der ionisierten Substanz; V_{k_b} : Verteilungskoeffizient der freien Base; $1 + 10^{pK - pH}$: Ionisationsgrad; $1 + 10^{pH - pK}$: Ionisationsrest; Lip: Lipoidphase;

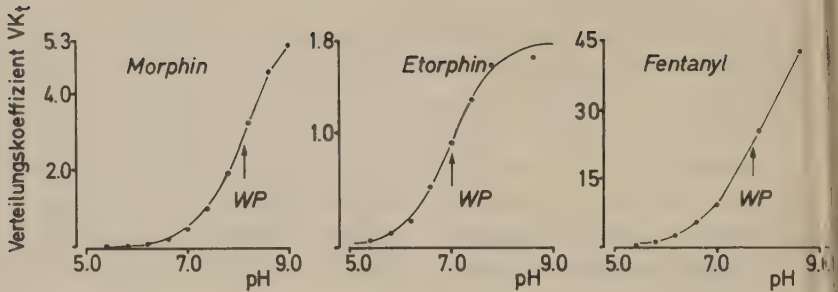


Abb. 14 Beziehung zwischen Bruttoverteilungskoeffizient VK_t (zusammengesetzt aus VK der ionisierten Substanz und VK der freien Base) und dem pH-Wert der wässrigen Phase; Die Wendepunkte (WP), d.h. die pK -Werte, wurden unter Anwendung der Gleichung (12) berechnet. Lipide Phase für Morphin: Oktanol, für Etorphin und Fentanyl: Heptan; Bestimmung bei 37°C ; Mittelwerte aus 5 Versuchen.

Abbildung 14 zeigt die Abhängigkeit des VK_t vom pH-Wert in der wässrigen Phase für Morphin, Fentanyl und Etorphin. Die Abbildung zeigt, daß mit zunehmender Ionisierung, d.h. mit fallendem pH-Wert im Fall der hier untersuchten organischen Basen, der Wert des Bruttoverteilungskoeffizienten abnimmt, wie es bei Annahme hydrophober Wechselwirkungen zu erwarten ist. Der Maximalwert des Bruttoverteilungskoeffizienten, dem die Kurven mit steigendem pH-Wert zustreben, entspricht dem Verteilungskoeffizienten der freien Base. Der Wert des Bruttoverteilungskoeffizienten geht für alle drei Substanzen bei niedrigen pH-Werten, bei denen die Verbindungen nahezu vollständig ionisiert sind, gegen Null. Das bedeutet, daß die ionisierte Form der Substanzen nicht in die organische Phase übergeht. (Die Möglichkeit, daß auch ionisierte Substanzen von organischen Lösungsmitteln aufgenommen werden können, zeigten MURTHY und ZOGRAFI (1970) am Beispiel des Verteilungskoeffizienten Oktanol/Wasser für Chlorpromazin; so tritt Chlorpromazin als Ionenpaar zu einem bestimmten Teil in das Oktanol über, während diese Substanz in ihrer ionisierten Form nicht in die Lipoidphase übergeht, wenn man als organisches Lösungsmittel Dodekan verwendet).

Da also in unserem Fall der Verteilungskoeffizient der ionisierten Substanz (VK_i) gleich 0 zu setzen ist, vereinfacht sich die

Gleichung (11) zu:

$$V_{k_t} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} \cdot V_{k_b} \quad (12)$$

Dieser Gleichung entsprechen demnach die in Abbildung 14 gezeigten Kurvenverläufe. Ihre sigmoidale Form ist kennzeichnend für die Dissoziationsrestkurven von basischen Verbindungen. Die Wendepunkte der Kurvenverläufe entsprechen den pK-Werten der Substanzen. Interessanterweise stimmen dieselben mit den pK-Werten, wie sie in Wasser bestimmt wurden, in etwa überein (siehe Abbildung 1). Der Einfluß der Ionenkonzentration des Puffers, sowie der organischen Lösungsmittel (Heptan und Oktanol) auf die pK-Werte der Substanzen scheint also nur von geringer Bedeutung zu sein. Bei höheren pH-Werten sind allerdings Abweichungen von der einfachen Beziehung der Gleichung (12) zu erwarten, da in diesem Bereich bei den Substanzen Morphin und Etorphin eine Dissoziation weiterer Gruppen am Molekül zu erwarten ist.

342 Abhängigkeit der Bindung an Plasmaproteine vom pH-Wert der Proteinlösung

Ausgehend von einer Zunahme der Bindung bei wachsender Lipidlöslichkeit der Substanzen bei pH 7,4, war zu erwarten, daß sich die Bindung mit zunehmenden Anteil an freier Base erhöhen würde; im Falle der hier vorliegenden organischen Basen also mit steigendem pH-Wert. Daher wurde der Ionisationsgrad der Substanzen als weiterer Parameter neben den bereits berücksichtigten Größen n und k in die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Gleichungen (SCATCHARD, ROSENTHAL) eingeführt (siehe Gleichungen (1) und (2), 232).

(Mit Index i sind in den folgenden Gleichungen die Parameter der ionisierten Form der Substanzen versehen, mit Index b die der freien Base und mit Index t die des Gesamtsystems).

Für die ionisierte Form der Substanzen gilt nach SCATCHARD:

$$r_i = k_i (n_i - r_i) c_{fi}$$

Für die freie Base gilt:

$$r_b = k_b (n_b - r_b) c_{fb}$$

Für die Gesamtbindung der partiell ionisierten Substanzen folgt:

$$\frac{r_t}{c_{ft}} = \frac{r_i + r_b}{c_{ft}} = \frac{c_{fi}}{c_{ft}} k_i (n_i - r_i) - \frac{c_{fb}}{c_{ft}} k_b (n_b - r_b) \quad (13)$$

Hierbei ist:

$$\frac{c_{fi}}{c_{ft}} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} = \text{Dissoziationsgrad der organischen Base}$$

$$\frac{c_{fb}}{c_{ft}} = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} = \text{Dissoziationsrest der organischen Base}$$

Daraus folgt:

$$\frac{r_t}{c_{ft}} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} k_i (n_i - r_i) + \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} k_b (n_b - r_b) \quad (14)$$

Falls r_b und r_i sehr viel kleiner sind als n_b bzw. n_i , was für die hier untersuchten Substanzen zutrifft (siehe 312), vereinfacht sich die Gleichung:

$$\frac{r_t}{c_{ft}} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} k_i n_i + \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} k_b n_b \quad (15)$$

Analog dazu erhält man aus der Gleichung nach ROSENTHAL:

$$\frac{c_{gt}}{c_{ft}} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK}} k_i n_i c_{pt} + \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} k_b n_b c_{pt} \quad (16)$$

Diese Gleichungen gelten jedoch nur unter der Voraussetzung, daß

1. sich die Bindungsparameter n und k im Bereich der pH-Ver-schiebung nicht ändern;
2. die Bindungen der ionisierten Form und der freien Base nur jeweils durch eine Gesamtbindungskonstante beschrieben werden können.

In Abbildung 15 ist die pH-Abhängigkeit der Bindung von Etorphin und Fentanyl an 2,5 prozentiges Albumin bzw. aller vier Substanzen an Plasma dargestellt. Da mit Phosphatpuffer nur in einem Bereich bis pH 9,0 gepuffert werden konnte, wurde auf

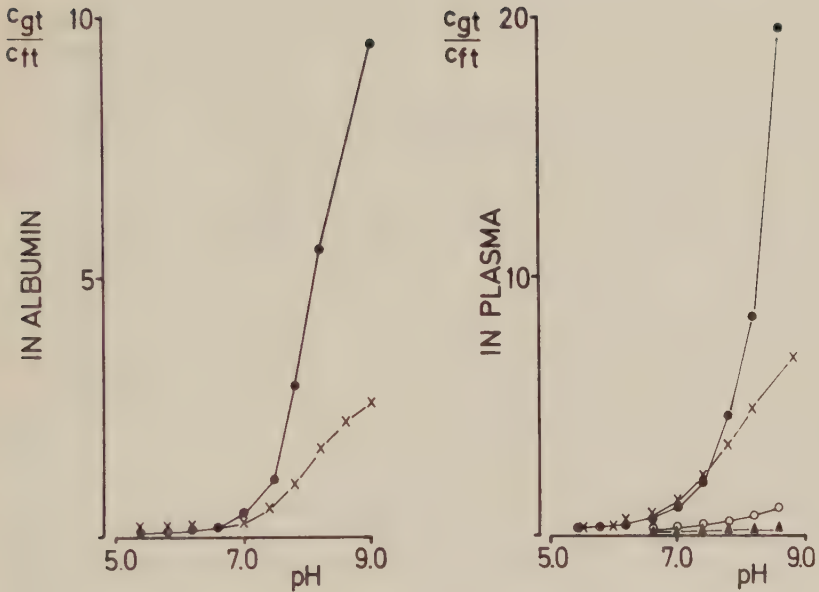


Abb. 15 Beziehung zwischen der Bindung (c_g/c_f) von ionisierter Substanz und freier Base an Albumin (2,5 g%) bzw. Plasma und den pH-Werten der Proteinlösungen.
Bestimmung der Bindung mittels Gleichgewichtsdialyse bei 37°C ($c_t = 10^{-7}$ Mol/l);
Mittelwerte aus 3 bis 5 Versuchen.

- ▲ - ▲ - ▲ - Dihydromorphen
- - ○ - ○ - Morphin
- - ● - ● - Fentanyl
- x - x - x - Etorphin

Bindungsbestimmungen bei höheren pH-Werten verzichtet, um die Versuchsbedingungen konstant zu halten.

Wie für hydrophobe Wechselwirkungen zu erwarten, wächst das Ausmaß der Bindung in beiden Proteinlösungen mit steigendem pH-Wert, d.h. mit steigender Konzentration an freier Base. Auch hier zeigt sich wie bei den Verteilungsversuchen der sigmoidale Kurvenverlauf, wie er für Dissoziationsrestkurven organischer Basen typisch ist. Allerdings wird auch die ionisierte Substanz in geringem Ausmaß gebunden - wie aus den Bindungswerten bei niedrigen pH-Werten hervorgeht. Wie auf Grund des Quotienten c_g/c_f bei pH 9 zu schließen, werden die freien Basen der Substanzen in ganz unterschiedlichem Ausmaß gebunden. Die Bindungen an Plasma sind im untersuchten pH-Bereich bei allen Substanzen höher als an 2,5 g prozentiges Albumin. Die Wendepunkte der Sigmoid-Kurven, die den pK-Werten der Substanzen in den Proteinlösungen entsprechen, unterscheiden sich von den in Wasser gemessenen im Gegensatz zu den, welche mittels Bestimmung der Verteilungskoeffizienten im betreffenden pH-Bereich erhalten wurden (vergleiche Abbildung 14).

Unter Anwendung von Gleichung (16) lassen sich aus den Gesamtbindungswerten c_{gt}/c_{ft} und den zugehörigen pH-Werten die Wendepunkte (WP) und die der Bindungscharakteristik entsprechende Ausdrücke $n \cdot k \cdot c_{pt}$ bzw. $n \cdot k$ für Base und ionisierte Substanz berechnen. Diese Werte $n_{ik} \cdot c_{pt}$, n_{ik} , $n_{bk} \cdot c_{pt}$ und n_{bk} entsprechen den Bindungen (c_g/c_f bzw. r/c_f) der ionisierten Substanz bzw. der freien Base, für den Fall, daß c_g sehr klein gegenüber $n \cdot c_{pt}$ ist; sie entsprechen den Asymptoten, denen sich die Sigmoidkurven annähern. Sind die Bindungskonstanten und Wendepunkte bekannt, so lassen sich die bei Variation der pH-Werte zu erwartenden Bindungskurven für freie Base und ionisierte Substanz darstellen, wie in Abbildung 16 gezeigt.

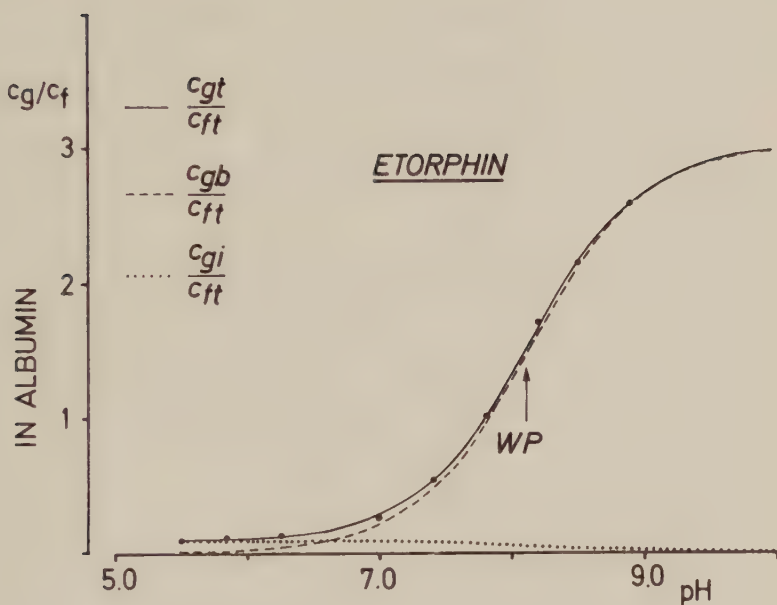


Abb. 16 Bindungen der ionisierten Substanz und der freien Base in Abhängigkeit vom pH-Wert der Proteinlösung dargestellt am Beispiel der Bindung von Etorphin an Albumin (2,5 g%); Bindungsbestimmung mittels Gleichgewichtsdialyse bei 37°C ($c_t = 10^{-7}$ Mol/l); Mittelwerte aus 3 bis 4 Versuchen;
 Ordinate: c_g/c_f für die Bindung der ionisierten Substanz, der freien Base und beider Substanzen;
 Abszisse: pH-Werte;

———— c_{gt}/c_{ft} (experimentell erhaltene Werte)
 ----- c_{gb}/c_{fb} (berechnet mittels Gleichung 16)
 c_{gi}/c_{fi} (berechnet mittels Gleichung 16)

4 DISKUSSION

41 Pharmakokinetische Aspekte

411 Unterschied zwischen den in vivo gefundenen Substanzkonzentrationen im Gewebe und den auf Grund der Bindung kalkulierten

Fentanyl wird an unverdünntes Gewebshomogenat weit höher gebunden als an Plasmaproteine. Dieser Unterschied erklärt jedoch nicht die hohen Konzentrationen, wie sie von HEB et al. (1971) im Gewebe im Vergleich zum Plasma gefunden wurden. Dieselbe Beobachtung machten KUNTZMAN et al. (1967) in ähnlichen Versuchen mit Norchlorcyclizin und Norcyclizin. Wie in unseren Versuchen, so waren auch dort die Bindungen dieser Substanzen an die verschiedenen Homogenate annähernd gleich, während sich die Konzentrationen in den betreffenden Geweben deutlich voneinander unterschieden. Natürlich lassen sich die Ergebnisse der Bindungsversuche nur mit den in vivo gemessenen Konzentrationen vergleichen, wenn die Konzentrationen im Organismus zueinander im Gleichgewicht stehen. Das ist bei Fentanyl 60 Minuten nach Applikation der Substanz auch der Fall gewesen mit wenigen Ausnahmen: Dazu gehört die Konzentration in der Niere wegen der dort stattfindenden Eliminationsvorgänge und in der Leber wegen deren Funktion als Metabolisierungs- und Exkretionsorgan. In der Lunge und im Gehirn sollten jedoch dem Gleichgewicht entsprechende Konzentrationen erreicht sein, d.h. das Verhältnis Konzentration im Plasma / Konzentration im Gewebe sollte dem Verhältnis Bindung im Plasma / Bindung im Gewebe entsprechen. Das ist aber insbesondere bei der Lunge nicht der Fall: Die Bindung in der Lunge scheint nämlich im intakten Gewebe größer zu sein als im Homogenat: Einem Kaninchen, dem i.v. Fentanyl injiziert worden war, wurde die Lunge entnommen. Ein Teil der Lunge wurde in kleine Stücke geschnitten, ein anderer homogenisiert. Ultrafiltration der beiden Proben ergab eine geringere Bindung an das homogenisierte Lungengewebe.

412 Zunahme des Quotienten Konzentration im Gewebe / Konzentration im Plasma mit zunehmender Lipophilie

Die Bindungen der verschiedenen Substanzen an das Homogenat eines bestimmten Organs (in unserem Fall Gehirn) stufen sich jedoch genauso ab, wie die sich in vivo einstellenden Substanzkonzentrationen im betreffenden Gewebe. Der Quotient Konzentration im Gewebe / Konzentration im Plasma wächst dabei mit zu-

nehmender Lipophilie der Substanz. Dies läßt sich auch aus Untersuchungen von GOLDBAUM und SMITH (1954) mit Barbituraten schließen. CURRY (1970) fand bei Chlorpromazin, das sehr hoch im Plasma gebunden wird (über 90%) im Durchschnitt einen um das Hundertundvierzigfache höheren Gewebsspiegel. Die Tatsache, daß die Bindung im Gewebe prinzipiell höher ist als im Plasma, scheint verständlich, da die hydrophobe Wechselwirkung mit zunehmender Lipophilie der Reaktionspartner wächst; Gewebsstrukturen dürften lipophiler sein als Plasmaproteine, welche aus Gründen der Löslichkeit im wässrigen Medium eine gewisse Hydrophilie besitzen müssen.

413 Einfluß von Änderungen der Bindung im Plasma und im Gewebe auf die Verteilung der Pharmaka

Änderungen der Bindung im Plasma oder in den Geweben können die Verteilung von Substanzen zwischen Gewebe und Plasma verändern. Nach dem von MARTIN (1965) aufgestellten Modell, das die Bindung in den Geweben unberücksichtigt läßt, kann die Änderung der Plasmapbindung nur dann zu einer nennenswerten Änderung der Substanzkonzentrationen im Gewebe führen, wenn die Bindungskonstante $n \cdot k$ größer als 10^4 l/Mol ist. Da in unserem Fall die am stärksten gebundene Substanz (Fentanyl) nur eine Bindungskonstante von $3 \cdot 10^3$ (l/Mol) besitzt, wäre demnach die Plasmapbindung der hier untersuchten morphinartigen Analgetika für die Substanzkonzentration im Gewebe nur von untergeordneter Bedeutung. Bezieht man hingegen auch die Gewebsbindungen in solche Betrachtungen mit ein, wie es in dem von CURRY (1970) aufgestellten Modell geschah, so wird man Bindungsänderungen in den Geweben einen merklichen Einfluß auf die Verteilung der Substanzen zuschreiben müssen. Bei Chlorpromazin fand CURRY (1970) Rückverteilungen vom Gewebe ins Plasma, die durch Bindungsänderungen in den Geweben verursacht worden waren. In unserem Fall würde beispielsweise eine Azidose die Verschiebung von Fentanyl in den Plasmaraum bewirken und so eine Abnahme der Wirkung und eine erhöhte renale Ausscheidung durch die Niere nach sich ziehen.

42 Spezifische Bindung morphinartiger Analgetika

421 Möglichkeiten und Versuche, die Bindung eines Pharmakons an seine Rezeptoren in vitro nachzuweisen

Versuche, die Bindung eines Pharmakons an seine Rezeptoren in vitro nachzuweisen, erfolgen meist mittels Ausnutzung mutmaß-

licher Eigenschaften spezifischer Pharmakon-Rezeptor-Interaktionen gegenüber unspezifischen Bindungen, wie z.B. höhere Affinität des Pharmakons zum Rezeptor, geringe Bindungsstellenanzahl, die Möglichkeit kompetitiver Verdrängung aus der Bindung durch Antagonisten, Stereospezifität u.a. (MARCHBANKS 1965, EHRENPREIS et al. 1969, GOLDSTEIN et al. 1971).

MARCHBANKS (1965) konnte zeigen, daß gewisse subzelluläre Fraktionen von Gehirngewebe bei geringen Konzentrationen von Serotonin eine besonders hohe Affinität zu dieser Substanz besaßen. Bei höheren Serotoninkonzentrationen war die Affinität für alle untersuchten Proteine gleich. HUG und OKA (1971) fanden für Dihydromorphin eine besonders hohe Affinität zu bestimmten Nervenzellfraktionen des Rattengehirns, die durch Nalorphin vermindert wurde. GOLDSTEIN et al. (1971) versuchten die spezifische Bindung von Levorphanol an Homogenat und Zellfraktionen des Mäusegehirns nachzuweisen. Sie rechneten dabei mit drei Arten von Bindung: mit unspezifisch nicht sättigbarer, unspezifisch sättigbarer und spezifisch sättigbarer Bindung. Sie versuchten durch den optischen Antipoden Dextrorphan die unspezifische Bindungskomponente zu blockieren ohne dabei die spezifische zu blockieren. Die Annahme, daß sich optische Isomere hinsichtlich ihrer Affinität zu unspezifischen Bindungsstellen nicht unterscheiden, scheint jedoch nicht durchwegs gerechtfertigt, da BÜCH et al. (1970) einen hochgradigen Bindungsunterschied optischer Barbituratisomere an Albumin fanden.

422 Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen GOLDSTEINS et al. (1971)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen GOLDSTEINS zeigt sich in unseren Versuchen bei der Bindung von Morphin an Kaninchengehirnhomogenat innerhalb eines sehr weiten Konzentrationsbereichs zwischen 10^{-8} und 10^{-3} Mol/l die gleiche Bindung, d.h. kein Anzeichen einer Sättigung. Dies steht im Einklang mit den Resultaten von VAN PRAAG und SIMON (1966), die für die Bindung von Dihydromorphin an Rattengehirnhomogenat ($g/V = 0,2$) ebenfalls eine konstante Bindung für einen Konzentrationsbereich von 20 $\mu g/ml$ bis 1000 $\mu g/ml$ fanden, wobei allerdings die geringste Konzentration mehr als drei Zehnerpotenzen größer war als die von uns gewählte kleinste Morphinkonzentration (0,01 $\mu g/ml$).

Als mögliche Erklärung für die fehlende Sättigungscharakteristik der Morphin-Gehirnhomogenat-Bindung kommen mehrere Ursachen in Frage:

- a) die Anzahl der spezifischen oder unspezifischen, sättigbaren Bindungsstellen ist im untersuchten Homogenat so gering, daß diese bereits bei Morphinkonzentrationen von 10^{-8} Mol/l abgesättigt sind.
- b) die Affinität der Substanz zu diesen Bindungsstellen ist sehr niedrig
- c) das Homogenat enthält keine spezifischen Bindungsstellen mehr, da diese während des Homogenisiervorgangs zerstört wurden.

423 Bedeutung der ionalen Bindungskomponente für die Rezeptor-Interaktion

Nach dem Rezeptormodell von BECKETT (1959) spielt bei der spezifischen Bindung morphinartiger Analgetika eine Ionenbindung eine wichtige Rolle. So konnten BECKETT und GREENHILL (1961) zeigen, daß der ionisierte Stickstoff Voraussetzung für die analgetische Wirkung synthetischer Morphinanaloga ist. Ebenso fanden BIERSE und STEVENSON (1960), daß die Ionenbindung in der Rezeptor-Interaktion morphinartiger Analgetika involviert sein muß. In der Arbeit von KUTTER et al. (1970) findet sich ebenfalls ein Hinweis auf die Bevorzugung polarer Analgetika vom Morphintyp hinsichtlich der spezifischen Wirkung.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß ein ionaler Bindungstyp gegenüber der hydrophoben Wechselwirkung bei der unspezifischen Bindung der untersuchten morphinartigen Analgetika nur von untergeordneter Bedeutung ist. Im Hinblick auf die Hypothese BECKETTS, daß ionale Bindungskräfte wesentlich bei der spezifischen Bindung dieser Substanzen beteiligt sind, sollte man bei einer in vitro Analyse spezifischer Bindungsstellen die Ionenbindung im Gegensatz zur hydrophoben Wechselwirkung zu begünstigen versuchen, z.B. durch die Verwendung von Puffern mit geringer Ionenstärke, durch Bindungsbestimmung bei niedrigen pH-Werten, bei denen die Substanzen fast völlig ionisiert sind und eventuell durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Dioxan. Allerdings könnten solche Veränderungen des Bindungsmediums die Eigenschaften der Rezeptoren beeinflussen. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen gegenüber der Anzahl an unspezifischen zu erhöhen und nur Gewebsareale des Gehirns für die Bindungsbestimmung heranzuziehen, in denen der Rezeptor mit höchster Wahrscheinlichkeit liegt (HERZ und TESCHAMACHER 1971).

43 Hydrophobe Wechselwirkung

431 Korrelation von Bindung und Verteilungskoeffizient

Versuche, an Hand einer Korrelation von Bindung und Verteilungskoeffizient eine hydrophobe Wechselwirkung nachzuweisen, wurden in größerem Ausmaß von HANSCH et al. (1965) und SCHOLTAN (1968) unternommen. Anstatt des Logarithmus der gebundenen Fraktion wie er von HANSCH benützt wird, haben wir in Anlehnung an BIRD und MARSHALL (1967) den $\log c_g/c_f$ als Bindungsparameter gewählt. Das erschien vorteilhafter, da der Quotient c_g/c_f direkt analog zum Verteilungskoeffizienten gebildet ist; weiterhin entspricht c_g/c_f

für sehr kleine Substanzkonzentrationen der Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$ ($= K_1$). Aus unseren Versuchen ergibt sich eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus des Quotienten c_g/c_f und dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten. Die Neigung der Geraden ist jedoch geringer als die von SCHOLTAN (1968) für verschiedene Substanzgruppen bestimmte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß SCHOLTAN in seinen Versuchen Isobutanol als Lipoidphase verwendete, während hier Oktanol gewählt wurde.

432 Bindungsverhalten bei Änderung der Ionenkonzentration

Durch Veränderung der Ionenkonzentration in der wässrigen Phase ist es möglich, Hinweise zu erhalten, ob der Bindungsreaktion vornehmlich ein ionaler oder ein hydrophober Bindungstyp zugrunde liegt (KAUZMANN 1959, SCHOLTAN 1964, WEDER und BICKEL 1970). In unserm Fall nahm die Bindung von Morphin und Fentanyl mit steigender Ionenstärke des Puffers (was einer Erhöhung der Dielektrizitätskonstante entspricht) zu, was den hydrophoben Charakter der Bindung wahrscheinlich macht. Eine ähnliche Bindungserhöhung mit zunehmender Ionenkonzentration erhielten GOLDBAUM und SMITH (1954) für Thiopental und WEDER und BICKEL (1970) für Imipramin. Eine gleichfalls für die hydrophobe Wechselwirkung charakteristische Bindungsabnahme durch Verringerung der Dielektrizitätskonstante der wässrigen Phase bzw. durch Verringerung des Entropie-Effekts durch Zusatz von Dioxan fanden SCHOLTAN (1964) für Sulfamethoxydiazin und KUSCHINSKY (1970) für Digtoxin. Interessanterweise konnten VAN PRAAG und SIMON (1966) eine Abnahme der Bindung von Dihydromorphin an Rattengehirnhomogenat zeigen, wenn die Ionenstärke des Puffermediums erhöht wurde. Dies spricht dafür, daß eine Ionenbindung in diesem Fall eine

größere Rolle spielt. Ein solches Ergebnis muß nicht unbedingt im Widerspruch zu den von uns gefundenen Resultaten stehen. Gerade bei einer relativ hydrophilen Substanz wie Dihydromorphin könnte der Anteil einer Ionenbindung an der Gesamtbindung von Bedeutung sein.

433 Temperaturabhängigkeit der Bindung

Eine weitere Möglichkeit, eine hydrophobe Wechselwirkung nachzuweisen, ergibt sich aus der charakteristischen Temperaturabhängigkeit dieser Bindungsreaktion. Als endothermer, vornehmlich entropiegesteuerter Vorgang nimmt die Bindung mit steigender Temperatur zu. Für aliphatische Gruppen erreicht sie ein Maximum bei 58°C, für aromatische Gruppen bei 42°C (NEMETHY 1967). Diese Bindungszunahme zeigt sich fast in allen Bindungsversuchen. Ausnahmen machen hier in wenigen Fällen die hydrophilen Substanzen Dihydromorphin und Morphin. Da eine Zunahme der Bindung in Richtung niedriger Temperaturen kennzeichnend für einen ionalen Bindungstyp ist (CHO et al. 1971), gewinnt eine Beteiligung dieser Bindungsart an der Gesamtbindung hydrophiler Substanzen weiter an Wahrscheinlichkeit.

434 pH-Abhängigkeit der Bindung

Ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen einer hydrophoben Wechselwirkung ergibt sich aus der pH-Abhängigkeit der Bindung. Mit abnehmender Ionisation der Substanzen nimmt die Bindung stark zu. Für die Bindung von Etorphin an Albumin zeigt sich dabei im Bindungs- ($^{\circ}\text{g}/\text{c}_f$) / pH-Diagramm ein Kurvenverlauf, wie er der Dissoziationsrestkurve dieser Substanz entspricht, d.h. es wird fast ausschließlich nicht ionisierte Substanz gebunden. Ein geringer Teil des Etorphin wird allerdings auch bei pH-Werten, bei denen die untersuchten Pharmaka völlig dissoziiert sind, an Albumin bzw. Plasma gebunden. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Bindung ionaler Natur ist, oder ob sie ebenfalls als hydrophobe Wechselwirkung anzusehen ist. Daß auch die hydrophobe Bindung einer ionisierten Substanz möglich ist, zeigten die Ergebnisse von CONN und LUCHI (1961): während die diionisierte Form von Chinidin praktisch nicht gebunden wird, wird die monoionisierte Form geringgradig, die unionisierte stark von Albumin gebunden. Wenn in unserem Fall eine hydrophobe Bindung der ionisierten Substanzen vorliegen würde, müßte die Bindung der ionisierten Formen lipophiler Substanzen wie Fentanyl und Etorphin größer sein

als die des Morphins. Bei niedrigen pH-Werten, bei denen die Substanzen fast nur in ionisierter Form vorliegen, ist die Bindung von Fentanyl, Etorphin, Morphin und Dihydromorphin an Kaninchenplasma ungefähr gleich. Dies spricht dafür, daß die Bindung der ionisierten Substanzen vornehmlich als Ionenbindung erfolgt.

44 Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert der Proteinklösung

Eine pH-Abhängigkeit der Albuminbindung fanden GOLDBAUM und SMITH (1954) bei Barbituraten, KEEN (1965) bei Penicillinen, SCHOLTAN (1964) bei Sulfonamiden und KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY (1968) bei Phenothiazinen. Als Erklärung kommen mehrere Ursachen in Frage:

- a) das Albumin ändert seine Bindungseigenschaften
- b) die Substanz ändert ihren Dissoziationsgrad
- c) die Eigenschaften der wässrigen Phase ändern sich in Abhängigkeit vom pH-Wert.

441 Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf die Bindungseigenschaften des Albumins

Das Albumin ändert seine Bindungseigenschaften in zweierlei Hinsicht: Nettoladungszustand und Konformation des Moleküls variieren in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Eine Ladungsänderung kann die Änderung einer Ionenbindung bedeuten. Ausgehend vom isoelektrischen Punkt (pH 4,9) nimmt die Anzahl der negativen Ladungen am Albuminmolekül mit steigendem pH-Wert zu. Im Bereich von pH 5,0 bis pH 9,0 wird daher eine Bindung von Kationen in Richtung höherer pH-Werte zunehmen. Konformationsänderungen des Albumins können wiederum solche Ionenbindungen beeinflussen, indem sie geladenen Aminosäurerestgruppen demaskieren (HARMSEN et al. 1971).

Von besonderer Bedeutung sind solche Konformationsänderungen jedoch für die hydrophobe Wechselwirkung. Die hydrophobe Interaktion einfacher Kohlenwasserstoffe wird sogar dazu verwendet, die Struktur von Proteinen zu analysieren (ALI MOHAMMADZADEH et al. 1969). Besonders im pH-Bereich von 3 bis 5, sowie im alkalischen Bereich ab pH 10 nimmt die Hydrophilie und damit die Viskosität des Albumins durch Auffaltung und Schwellung des Moleküls zu und die hydrophobe Wechselwirkung ab. (TANFORD et al. 1955, AOKI und FOSTER 1956, WETLAUFER und LOVRIEN 1964). In kleinerem Ausmaß kommen Konformationsänderungen auch im pH-Bereich zwischen 6 und

und 9 als sogenannte "neutral transitioné" vor (LEONARD et al. 1963, HARMSEN et al. 1971). In diesem Bereich fanden WETLAUFER und LOVRIEN (1964) sowie RAY et al. (1966) einen Anstieg der Albuminbindung einfacher Kohlenwasserstoffe.

442 Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf den Dissoziationsgrad der Substanzen

Demgegenüber ist der Einfluß des pH-abhängigen Dissoziationsgrads auf die Bindung in der Literatur relativ wenig berücksichtigt. SCHOLTAN (1964) fand bei Sulfonamiden mit zwei oder mehr aromatischen Ringen eine umso höhere Bindung an Humanserum bei pH 7,4, je höher der Ionisationsgrad der Substanzen bei diesem pH-Wert war. KURZ und MOHR (1968) untersuchten die pH-Abhängigkeit der Bindung an Humanplasma im Bereich von pH 6,8 bis 8,2 bei Pharmaka, die in diesem Bereich ihre Dissoziation änderten; sie fanden, daß die Bindung weniger durch Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bindungseigenschaft der Proteine als durch die Änderung des Ionisationsgrads der Substanz beeinflusst wird.

443 Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf die Eigenschaften der wässrigen Phase

Als dritter Faktor ist auch eine durch pH-Verschiebung verursachte Veränderung der Eigenschaften der wässrigen Phase in Betracht zu ziehen. So kann eine durch pH-Verschiebung bedingte Änderung der Ionenstärke des Puffers und der H^+ -Ionenkonzentration eine Änderung der Dielektrizitätskonstante hervorrufen bzw. die Ionisationstendenz der Substanz beeinflussen.

444 Die Änderung des Ionisationsgrads der untersuchten Analgetika in Abhängigkeit vom pH-Wert

Betrachtet man im Hinblick auf diese Überlegungen unsere Ergebnisse, so scheint hierbei der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Bindungsvermögen des Albumins von geringer Bedeutung zu sein. Dafür sprechen eine Reihe von Tatsachen:

a) Im untersuchten pH-Bereich von pH 5,0 bis 9,0 ist die Konformationsänderung des Albuminmoleküls relativ gering (HARMSEN et al. 1971); somit ist eine dadurch bedingte Veränderung der hydrophoben Bindung nicht zu erwarten. Eine nennenswerte Ionenbindung, die durch Ladungsänderungen am Protein beeinflusst werden könnte, liegt, wie gezeigt werden konnte, nicht vor.

b) Im Fall einer Zunahme der hydrophoben Bindung, die durch ein vermehrtes Bindungsvermögen des Albumins oder des Plasma bedingt

wäre, müßte der größte Bindungsanstieg für alle Substanzen im gleichen pH-Bereich erfolgen. Dies trifft jedoch nicht zu.

c) Die Kurvenverläufe, wie sie in den pH/Bindungs-Diagrammen erhalten wurden, entsprechen denen der Verteilungskoeffizienten/pH-Diagramme. Dies zeigt, daß eine Beeinflussung von Seiten des Albumins oder der Plasmaproteine nur gering sein kann.

d) Auch die Änderung des Puffermediums bei pH-Änderung scheint für die Bindung der untersuchten Substanzen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Ionenstärke des verwendeten Phosphatpuffers steigt zwar zwischen pH 5,0 und 9,0 von 0,13 auf 0,39 an, der im Bereich von pH 6,5 erfolgende maximale Anstieg der Ionenstärke korreliert jedoch nicht mit dem maximalen Bindungsanstieg, der je nach Substanz erst bei pH 8,0 und höher liegt.

Aus solchen Betrachtungen geht hervor, daß die pH-Abhängigkeit der Bindung der untersuchten Substanzen in erster Linie durch Änderungen des Dissoziationsgrads der Substanzen bedingt ist. Daher erscheint die Beschreibung der experimentell erhaltenen Beziehung zwischen pH-Wert und Bindung durch die Gleichung (16) möglich. Schwierig allerdings erscheint die Interpretation unterschiedlicher pK-Werte von Etorphin in Phosphatpuffer und Albuminlösung. Als mögliche Ursachen kommen hierfür die unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten der Lösungen in Frage (NETTER 1959). Daneben kann sich der pK-Wert an Albumin gebundener Moleküle verändern; von KAUZMANN (1959) sind bei Substanzen, die zur Wasserstoffbrückenbindung mit den Aminosäureresten des Proteins befähigt sind, pK-Verschiebungen um ein bis zwei pH-Einheiten beschrieben worden.

444 Bedeutung des Dissoziationsgrads der Substanzen für die Bestimmung der Bindungsparameter nach SCATCHARD

Die Tatsache, daß die pH-Abhängigkeit der Bindung bei den untersuchten Substanzen vornehmlich durch Veränderung des Dissoziationsgrads der Pharmaka bedingt ist, hat für die Interpretation der Bindungsparameter, wie sie nach dem SCATCHARD-Plot vorgenommen wurden, wichtige Konsequenzen. Im Fall der hier untersuchten Substanzen wird bei pH 7,4 praktisch nur die nicht ionisierte Form gebunden. Die mittels des SCATCHARD-Plots bestimmten Konstanten k und $n k$ sind deshalb - bezogen auf die tatsächlich gebundener nicht ionisierte Form - zu niedrig, wie aus Gleichung (14) abgeleitet werden kann. Die Anzahl der Bindungsstellen n dagegen ist unabhängig vom Ionisationsgrad der Substanz, vor-

ausgesetzt, daß das Albumin seine Bindungseigenschaft nicht ändert. Das zeigt sich bei Verschiebung des pH-Wertes im Falle partiell ionisierter Substanzen, wie z.B. bei der Bindung von Chinidin an Albumin (CONN und LUCHI 1960): Im pH-Bereich von 5,5 bis 8,0 steigt die Assoziationskonstante um mehr als das Fünffache an, während die Anzahl der Bindungsstellen konstant bleibt. Erst bei pH 10,0 steigt auch die Zahl der Bindungsstellen an, was durch eine in diesem alkalischen Bereich bedingte Konformationsänderung des Proteins verursacht sein könnte. Weiterhin ist von Bedeutung, daß aus einem Kurvenverlauf im SCATCHARD-Diagramm nicht unbedingt auf zwei oder mehrere Gruppen von Bindungsstellen am Protein für eine der beiden Substanzformen geschlossen werden muß, sondern daß solchen Bindungsstellengruppen auch die beiden im System vorliegenden Substanzformen zugeordnet sein können. Interessanterweise zeigen Pharmaka, bei denen zwei Bindungstypen bekannt sind, z.B. hydrophobe Wechselwirkung und Ionenbindung (Sulfonamide SCHOLTAN 1964, Barbiturate GOLDBAUM und SMITH 1954), zwei Bindungsstellengruppen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindungen von ^3H -Dihydromorphin, ^{14}C -Morphin, ^3H -Etorphin und ^3H -Fentanyl an Humanalbumin, Humanplasma, Kaninchenplasma und verschiedene Organhomogenate des Kaninchens wurden mittels Gleichgewichtsdialyse- und Ultrafiltrationsmethode untersucht. Bei einer Substanzkonzentration von 10^{-7} Mol/l in Humanplasma wird Dihydromorphin zu 14%, Morphin zu 23%, Etorphin zu 88% und Fentanyl zu 70% gebunden. Für die Bindung an Humanalbumin wurden die Gesamtbindungskonstanten $n \cdot k$ bestimmt.

Ausgehend von der Bindung an verdünntes Gewebshomogenat des Kaninchens wurde mittels eines von SCHANKER und MORRISON beschriebenen Extrapolationsverfahrens die Bindung an unverdünntes Gewebshomogenat bestimmt. Die Abstufungen der in Verteilungsstudien in einigen Geweben erhaltenen Fentanylkonzentrationen ließen sich auf der Basis der so bestimmten Bindungen nicht erklären. Dagegen entsprach die Abstufung der für drei Substanzen gemessenen Konzentrationen im Gehirn der Bindung der Substanzen im Gehirnhomogenat.

Die enge Beziehung zwischen Bindung und Verteilungskoeffizient, die Zunahme der Bindung mit steigender Temperatur sowie mit steigender Ionenstärke und die Erhöhung der Bindung mit abnehmender Ionisation der Substanz charakterisieren die Bindung als hydrophobe Wechselwirkung.

Die Abhängigkeit der Bindung an Proteine vom pH-Wert der wässrigen Phase bzw. der Proteinklösung wurde durch eine Gleichung beschrieben. Die Änderung der Bindung im Bereich der pH-Verschiebung scheint nicht von Änderungen der Bindungseigenschaften des Proteins, sondern allein von Änderungen des Ionisationsgrads der Substanzen abzuhängen. Die ionisierte Form wird nur minimal gebunden.

Die Bindung von Morphin an Gehirnhomogenat war innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 10^{-8} bis 10^{-3} Mol/l konstant: sättigbare Gruppen unspezifischer bzw. spezifischer Bindungsstellen konnten somit nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse werden unter dem Aspekt pharmakokinetischer Fragestellungen und im Hinblick auf den Bindungsmechanismus diskutiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ali Mohammadzadeh, K., Feeney, R.E. and Smith, L.M.: Hydrophobic Binding of Hydrocarbons by Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 194: 246, 1969
- Beckett, A.H.: Stereochemical factors in biological activity. *Fortschr. Arzneimittelforsch.* 1: 455, 1959
- Beckett, A.H. and Greenhill, J.V.: Weakly basic analogues of potent analgesics. *J. Med. Pharm. Chem.* 4: 423, 1961
- Bickel, M.H. and Weder, H.J.: Buccal absorption and other properties of pharmacokinetic importance of imipramine and its metabolites. *J. Pharm. Pharmacol.* 21: 160, 1969
- Biers, H. and Stevenson, G.W.: The active form of the narcotic analgesic molecule. *Federat. Proc.* 19: 272, 1960
- Bird, A.E. and Marshall, A.C.: Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients. *Biochem. Pharmacol.* 16: 2275, 1967
- Blaney, D.J. and Woods, L.A.: Plasma protein binding of morphine. *J. Pharmacol.* 116: 7, 1956
- Brodie, B.B. and Hogben, C.A.M.: Some physico-chemical factors in drug action. *J. Pharmacol.* 9: 345, 1957
- Büch, H., Knabe, J., Buzello, W. and Rummel, W.: Stereospecificity of Anaesthetic Activity, Distribution, Inactivation and Protein Binding of the Optical Antipodes of two N-methylated Barbiturates. *J. Pharmacol.* 175: 709, 1970
- Büchi, J.: Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthetischen Arzneimittel. Birkheimer, Basel, 1963
- vom Bruck, C.G. und Kuhne, J.: Zur Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrafilter-Methode. *Arzneimittel-Forsch.* 12: 1116, 1962
- Cho, M.J., Mitchell, A.G. and Pernarowski, M.: Interaction of Bis-hydroxycoumarin with Human Serum Albumin. *J. Pharm. Sci.* 60: 196, 1971
- Conn, H.L.Jr., and Luchi, R.J.: Ionic Influences on Quinidine-Albumin Interaction. *J. Pharmacol.* 133: 76, 1961
- Curry, S.H.: Theoretical changes in drug distribution resulting from changes in binding to plasma proteins and to tissues. *J. Pharm. Pharmacol.* 22: 753, 1970
- Curry, S.H.: Plasma protein binding of chlorpromazine. *J. Pharm. Pharmacol.* 22: 193, 1970
- Ehrenpreis, S., Fleisch, J.H. and Mittag, T.W.: Approaches to the Molecular Nature of Pharmacological Receptors. *Pharmacol. Reviews* 21: 131, 1969

- Firemark, H., Barlow, C.F. and Roth, L.J.: The Entry, Accumulation and Binding of Diphenylhydantoin-2-C¹⁴ in Brain. *Int.J.Neuropharmacol.* 2: 25, 1963
- Friemel, G.: Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten. Dissertation aus dem Pharmakologischen Institut der Universit. München, 1968
- Fujita, T., Iwasa, J. and Hansch, C.: A New Substituent Constant, Derived from Partition Coefficients. *J.Am.Chem.Soc.* 86: 5175, 1964
- Ganshorn, A. und Kurz, H.: Unterschiede zwischen der Proteinbindung Neugeborener und Erwachsener und ihre Bedeutung für die pharmakologische Wirkung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path.* 260: 117, 1968
- Gillette, J.: Reversible binding as a complication in relating the in vitro effect of drugs to their in vivo activity. *Proc.Sec.Int.Pharmacol.Meeting* 4: 9, 1965
- Goldbaum, L.R. and Smith, P.K.: The Interaction of Barbiturates with Serum Albumin and its possible relation to their disposition and pharmacological actions. *J.Pharmacol.* 111: 197, 1954
- Goldstein, A.: The interaction of drugs and plasma proteins. *Pharmacol.Rev.* 1: 102, 1949
- Goldstein, A., Lowney, L.I., and Pal, B.K.: Stereospecific and Non-specific Interactions of the Morphine Congener Levorphanol in Subcellular Fractions of Mouse Brain. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 68: 1742, 1971
- Hansch, C., Steward, A.R., Iwasa, J., and Deutsch, E.W.: The Use of a Hydrophobic Bonding Constant for Structure-Activity Correlations. *Mol.Pharmacol.* 1: 205, 1965
- Harmsen, B.J.M., De Bruin, S.H., Janssen, L.H.M., Rodrigues De Miranda, J.F., and Van Os, G.A.J.: pK Change of Imidazole Groups in Bovine Serum Albumin Due to the Conformational Change at Neutral pH. *Biochemistry* 10: 3217, 1971
- Herz, A. and Teschemacher, H.J.: Activities and Sites of Antinociceptive Action of Morphin-like Analgesics. *Adv. Drug Res.* 6: 79, 1971
- Heß, R., Herz, A. and Friedel, K.: Pharmacokinetics of Fentanyl in View of the Importance for Limiting the Effect. *J.Pharmacol.* 170: 474, 1971
- Heß, R., Leschem, D., Teschemacher, H.J. and Herz, A.: A simple method for the separate estimation of labeled drugs and their metabolites by liquid scintillation counting. *Europ.J.Clin.Pharm.* 5: 104, 1972
- Hug, C.C.Jr., and Oka, T.: Uptake of Dihydromorphine-³H by Synaptosomes. *Life Sciences* 10: 201, 1971

- Jun, H., Mayer, R.T., Himel, C.M. and Iuzzi, L.A.: Binding Study of p-Hydroxybenzoic Acid Esters to Bovine Serum Albumin by Fluorescent Probe Technique. *J.Pharm.Sci.* 60: 1821, 1971
- Kauzmann, W.: Some Factors in the Interpretation of the Protein Denaturation, *Adv.Prot.Chem.* 14: 1, 1959
- Keen, P.M.: The Binding of Penicillins to Bovine Serum Albumin. *Biochem.Pharmac.* 15: 447, 1966
- Klotz, I.M. and Urquart, J.M.: The Binding of Organic Ions by Proteins. Buffer Effects. *J.Phys.Colloid Chem.* 53: 100, 1949
- Klotz, I.M. and Hunston, D.L.: Properties of Graphical Representations of Multiple Classes of Binding Sites. *Biochemistry* 10: 3065, 1971
- Kriegelstein, J.: Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln. *Klin. Wochenschrift* 47: 1125, 1969
- Kriegelstein, J. und Kuschinsky, G.: Über die Wechselwirkung von Phenothiazinderivaten mit Rinderserumalbumin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path.* 262: 1, 1969
- Kriegelstein, J., Lier, F. and Michaelis, J.: Albumin Binding and Hydrophobic Character of Promazine and Chlorpromazine Metabolites. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 272: 121, 1972
- Kuntzman, R., Tsai, T. and Burns, J.J.: Importance of Tissue and Plasma Binding in Determining the Retention of Norchlorcyclizine and Norcyclizine in Man, Dog and Rat. *J.Pharmacol.* 158: 332, 1967
- Kurz, H.: Die Bedeutung der Lipidlöslichkeit in der Pharmakologie. *Präparative Pharmazie* 6: 1, 1970
- Kurz, H. und Mohr, E.: Der Einfluß von Azidose und Alkalose auf die Bindung von Arzneimitteln an Plasmaproteine. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 260: 164, 1968
- Kuschinsky, K.: Über die Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen für Herzglykoside. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 262: 388, 1969
- Kuschinsky, K.: The Specificity of the Binding of Some Cardenolides to Human Serum Albumin. *Arzneim.-Forsch.* 20: 842, 1970
- Kutter, E., Herz, A., Teschemacher, H.J. and Hess, K.: Structure-Activity Correlations of Morphine-like Analgetics Based on Efficiencies Following Intravenous and Intraventricular Applications. *J.Med.Chem.* 13: 801, 1970
- Kwant, W.C. and Seeman, P.: The Membrane Concentration of a Local Anaesthetic (Chlorpromazine). *Biochim.Biophys. Acta* 181: 530, 1969

- Laviertes, P.: Anaerobic Ultrafiltration. *J. Biol. Chem.* 119: 267, 1937
- Leonard, W. Jr., Vijai, K. K. and Foster, J. F.: A Structural Transformation in Bovine and Human Plasma Albumins in Alkaline Solution as Revealed by Rotatory Dispersion Studies. *J. Biol. Chem.* 238: 1984, 1963
- Marchbanks, R. M.: Serotonin Binding to Nerve Ending Particles and other Preparations from Rat Brain. *J. Neurochem.* 13: 1481, 1966
- Martin, B. K.: Potential Effect of the Plasma Proteins on Drug Distribution. *Nature* 207: 274, 1965
- Martin, J., Wissner, H. und Doerr, P.: Untersuchung über den Normalbereich des Gesamteiweißes und der Eiweißfraktionen des Liquor cerebrospinalis nach elektrophoretischer Trennung auf Celluloseacetatfolie.
- Meyer, M. C. and Guttman, D. E.: The Binding of Drugs by Plasma Proteins. *J. Pharm. Sci.* 57: 895, 1968
- Mule, S. J., Redman, C. M. and Flesher, J. W.: Intracellular Disposition of ^3H -Morphine in the Brain and Liver of Non-tolerant and tolerant guinea pigs. *J. Pharmacol.* 157: 459, 1967
- Murthy, K. S. and Zograf, G.: Oil-Water Partitioning of Chlorpromazine and Other Phenothiazine Derivates Using Dodecane and n-Octanol. *J. Pharm. Sci.* 59: 1281, 1970
- Nemethy, G.: Hydrophobe Wechselwirkungen. *Angew. Chem.* 79: 260, 1967
- Netter, H.: Theoretische Biochemie. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959
- Olsen, G. D.: Methadone Binding to Human Plasma Albumin. *Science* 176: 525, 1972
- Perrin, D. D.: Dissociation constant of organic bases in aqueous solution. Butterworth London, 1965
- van Praag, D. and Simon, E. J.: Studies on the Intracellular Distribution and Tissue Binding of Dihydromorphine-7,8- ^3H in the Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 122: 6, 1966
- Ray, A., Reynolds, I. A., Polet, H. and Steinhardt, J.: Binding of large Organic Anions and Neutral Molecules by Native Bovine Serum Albumin. *Biochemistry* 8: 2606, 1966
- Rieder, J.: Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen an Sulfonamiden. *Arzneim.-Forsch.* 13: 81, 1963
- Rosenthal, H.: A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal. Biochem.* 20: 525, 1967

- Roth, S. and Seeman, Ph.: The Membrane Concentrations of Neutral and Positive Anaesthetics. *Biochim. Biophys. Acta* 255: 207, 1972
- Scatchard, G.: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660, 1949
- Schanker, L.S. and Morrison, A.S.: Physiological Disposition of Guanethidine in the Rat and its Uptake by Heart Slices. *Int. J. Neuropharmacol.* 4: 27, 1965
- Scheler, W.: Grundlagen der Allgemeinen Pharmakologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1969
- Scholtan, W.: Die Bindung der Langzeit-Sulfonamide an die Eiweißkörper des Serums. *Arzneim.-Forsch.* 11: 707, 1961
- Scholtan, W.: Über die Bindung der Langzeitsulfonamide an Serum-eiweißkörper. *Makromol. Chem.* 54: 24, 1962
- Scholtan, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper. *Arzneim.-Forsch.* 14: 348, 469, 1139, 1234; 1964
- Scholtan, W.: Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonukleinsäure. *Arzneim.-Forsch.* 18: 505, 1968
- Weder, H.J. and Bickel, M.H.: Interactions of Drugs with Proteins I. *J. Pharm. Sci.* 59: 1505, 1970
- Weder, H.J. and Bickel, M.H.: Interactions of Drugs with Proteins II. *J. Pharm. Sci.* 59: 1563, 1970
- Wetlaufer, D.B. and Lovrien, R.: Induction of Reversible Structural Changes in Proteins by Nonpolar Substances. *J. Biol. Chem.* 239: 596, 1964
- Wishnia, A. and Pinder, T.: Hydrophobic Interactions in Proteins: Conformation Changes in Bovine Serum Albumin below pH 5. *Biochemistry* 3: 1377, 1964

LEBENS LAUF

Am 24. Mai 1945 wurde ich als Sohn des jetzigen Rektors und Diplom Psychologen Leo Höllt und seiner Ehefrau Christiane, geb. Gamisch in Kaaden (CSSR) geboren.

Im Januar 1946 mußten wir meinen Geburtsort verlassen und fanden vier Monate in einem Münchner Flüchtlingslager Unterkunft. Im Mai 1946 wurde mein Vater als Lehrer an der Volksschule in Weyarn (Kreis Miesbach) angestellt und im September 1950 nach Marienstein im gleichen Landkreis versetzt. Hier besuchte ich von 1951 an die Volksschule.

1953 übersiedelten wir nach München. Ich ging in die Volksschule am Bayernplatz bis zur 4.Klasse und trat 1955 in das Maximilians-Gymnasium über, an dem ich 1964 das Abitur ablegte.

Im selben Jahr immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Fach Psychologie. Nach zwei Semestern Studium wechselte ich 1965 in die medizinische Fakultät über. 1968 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab; das Staatsexamen bestand ich am 22.Juli 1971.

Vom September 1971 bis Mai 1972 arbeitete ich als Stipendiat am Max-Planck-Institut für Psychiatrie bei Prof. Herz an der Fertigstellung meiner Doktorarbeit. Danach war ich bis September 1972 als Medizinalassistent in der II.chirurgischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing und von Oktober 1972 bis Januar 1973 in der III.medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Neuperlach tätig.

Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 31.1.1973

